



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS**

# **OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS NATURALES CON POTENCIAL ACTIVIDAD INHIBITORIA DE LA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA**

**LABORATORIO DE PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS**

**Natalia H. Durante**

**AÑO 2012**

**Directora: Dra Sandra Vairo Cavalli**

**Co director: Dr Walter David Obregón**



**Laboratorio de investigación  
de Proteínas Vegetales**

---

La Plata, Marzo de 2012

El presente trabajo para optar al título de Licenciada en Biotecnología y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, se llevó a cabo en el Laboratorio de Investigación de Proteínas Vegetales (LiProVe), Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, bajo la dirección de la Dra. Sandra Vairo Cavalli y la co-dirección del Dr. Walter David Obregón.



2012

*A mis padres Lidia y Daniel*

Con éste trabajo culmina una etapa de mi vida. Todos éstos años me ayudaron a crecer como persona, a luchar por lo que uno quiere, a perseverar y a intentarlo otra vez cuando las cosas no salen como uno espera.

A lo largo de este camino conocí mucha gente y de cada uno de ellos me llevo el mejor de los recuerdos.

Quiero agradecer por sobre todas las cosas a mi mamá y a mi papá que sin la ayuda que me brindaron, sin su apoyo incondicional, sin sus palabras de aliento cuando las cosas perdían su rumbo, no hubiese llegado hasta acá.

A mis hermanos Leti y Fer con quienes compartí toda esta etapa lejos de casa y siempre estuvieron ahí para escucharme y darme fuerzas para seguir.

A Juan por estar en las buenas y en las malas, por el amor que me brinda todos los días, por ser la persona con la que quiero compartir el resto de mi vida.

A mi directora de Tesis Dra. Sandra Vairo Cavalli y mi co-director Dr. Walter David Obregón por el apoyo y el aliento, por la paciencia que me tuvieron y sobre todo por enseñarme a crecer como futura profesional.

A todos los integrantes del LiProVe, en especial a Costi y Mariela, por estar conmigo y recibir su ayuda cuando más lo necesitaba.

A mis amigos de Chacabuco de toda la vida, a mis amigos de La Plata, a mis amigos y compañeros de estudio, a mis amigos de cursadas. A cada uno de ellos le doy las gracias por las charlas y mates compartidos, las horas de estudio, las salidas, las risas y los llantos, gracias por haber estado y estar conmigo de una u otra forma.

A la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Exactas, a todos los profesores, gracias por haberme educado y formado sin pedirme a cambio nada más que mi propio esfuerzo.

Muchas Gracias!

Natalia H. Durante

*Los objetivos generales del presente trabajo de Tesis de Grado fueron:*

- ❖ *Llevar a cabo una búsqueda bibliográfica profunda sobre un tema específico de investigación.*
- ❖ *Obtener adiestramiento en el manejo de procedimientos básicos de laboratorio: laboratorio:*
  - a. preparación de soluciones buffer y otros reactivos de uso común,*
  - b. obtención de extractos crudos,*
  - c. cuantificación de proteínas,*
  - d. determinación de la actividad enzimática empleando distintos sustratos,*
  - e. análisis de muestras proteicas por electroforesis y HPLC*
  - f. obtención de hidrolizados proteicos en condiciones controladas,*
  - g. determinación de propiedades biológicas de los productos obtenidos.*
- ❖ *Integrarse y adaptarse a un grupo de trabajo*
- ❖ *Formarse de un criterio experimental que permita poner a punto distintos tipos de ensayos y modificarlos según la situación lo requiera*
- ❖ *Resolver los problemas que se presenten (ya sean teóricos o experimentales)*

## CAPÍTULO 1

### INTRODUCCIÓN

<b>1. HIPERTENSIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. Relevancia de ésta enfermedad a nivel poblacional	1
1.2. Sistema renina - angiotensina	1
1.3. ECA como diana de las terapias contra la hipertensión	3
<b>2. ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACEUTICOS</b>	<b>3</b>
<b>3. PEPTIDOS BIOACTIVOS</b>	<b>4</b>
3.1. Definición	4
3.2. Fuentes de péptidos bioactivos	5
3.3. Liberación de péptidos encriptados en proteínas	5
3.4. Efectos de los péptidos bioactivos	5
3.5. Biodisponibilidad y sitios de acción.	8
<b>4. PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA</b>	<b>8</b>
4.1. Aplicación potencial en alimentos funcionales o productos médicos	8
4.2. Mecanismo de acción	9
4.3. Fuente de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima conversora de angiotensina	10
<b>5. LECHE COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS</b>	<b>10</b>
5.1. Composición de la leche	10
5.2. Péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas de la leche	11
<i>Objetivos específicos</i>	13

### MATERIALES Y MÉTODOS

<b>1. MATERIAL VEGETAL</b>	<b>14</b>
----------------------------	-----------

<b>2. METODOLOGÍA</b>	<b>15</b>
<b>2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Determinación del contenido de proteínas</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1. Método de Bradford</b>	<b>15</b>
<b>2.2.1.1. Método estándar (macrométodo)</b>	<b>16</b>
<b>2.2.1.2. Micrométodo</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2. Método de Lowry</b>	<b>16</b>
<b>2.2.2.1. Reactivos</b>	<b>17</b>
<b>2.2.2.1. Determinación</b>	<b>17</b>
<b>2.3. Actividad peptidásica</b>	<b>17</b>
<b>2.3.1. Ensayo de actividad caseinolítica</b>	<b>18</b>
<b>2.3.1.1. Cálculo de la actividad caseinolítica</b>	<b>18</b>
<b>2.4. Obtención de hidrolizados proteicos</b>	<b>19</b>
<b>2.4.1. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino en función del tiempo de reacción</b>	<b>19</b>
<b>2.4.2. Optimización del método para detener la reacción de hidrólisis</b>	<b>20</b>
<b>2.4.3. Análisis electroforético</b>	<b>21</b>

2.4.3.1. Electroforesis desnaturalizante discontinua en geles de poliacrilamida al 14% y al 20%	21
2.4.3.1.1. Preparación de las muestras	21
2.4.3.1.2. Preparación de los geles	22
2.4.3.1.3. Aplicación de las muestras	24
2.4.3.1.4. Condiciones de corrida	25
2.5. Tratamiento analítico de datos por densitografía	26
2.6. Determinación del grado de hidrólisis. Método del TNBS	26
2.7. Determinación de Actividad Biológica	27
2.8. Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	27
2.9. Aislamiento y purificación de los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados.	28
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. ANÁLISIS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO	29
2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS POR HIDRÓLISIS CONTROLADA	29
2.1. Optimización de la reacción de hidrólisis	29
2.2. Determinación del grado de hidrólisis por el método del TNBS	37
3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA: ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA	39
4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS HIDROLIZADOS	40
REFERENCIAS	45

## Capítulo 2

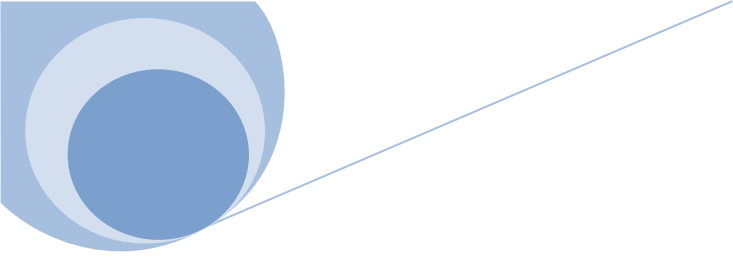
### INTRODUCCIÓN

1. INHIBIDORES DE PROTEASAS	50
1.1. Definición	50
1.2. Mecanismo de acción	50

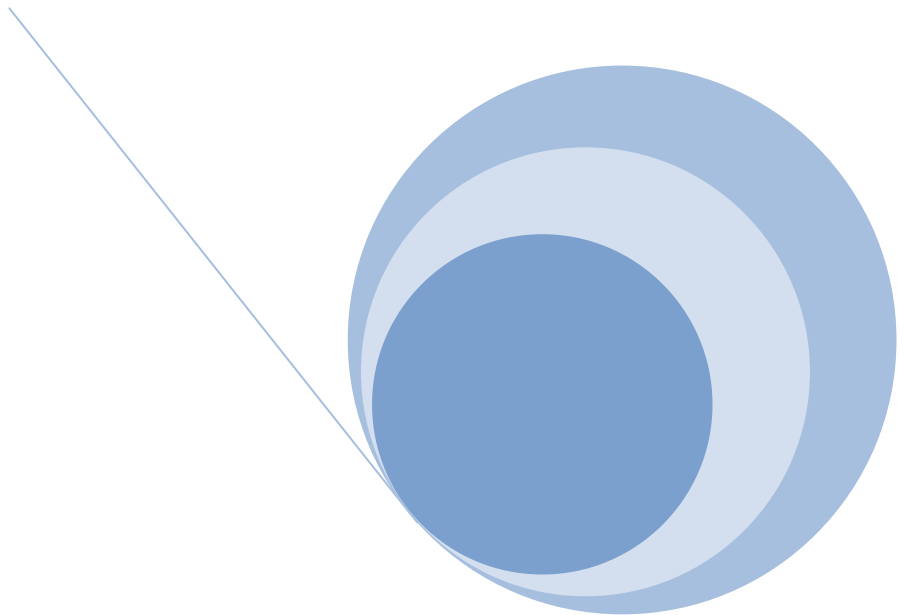


1.3.	Fuentes de inhibidores de proteasas	50
1.4.	Clases de inhibidores de proteasas en plantas	51
1.5.	Importancia del estudio de inhibidores de proteasas para su aplicación en biomedicina	51
2.	INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS	52
	<i>Objetivos específicos</i>	54
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>		
1.	MATERIAL VEGETAL	55
2.	METODOLOGÍA	56
2.1.	Obtención de extracto crudo de tubérculos de “malcacha”	56
2.2.	Determinación de la presencia de actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A en el EC de “malcacha”	56
2.2.1.	Actividad enzimática de Carboxipeptidasa A (CPA)	57
2.2.2.	Actividad inhibitoria de CPA	57
2.3.	Evaluación dosis-respuesta del EC de malcacha	57
2.4.	Perfil electroforético del EC de malcacha	57
2.5.	Tratamiento térmico del extracto crudo	58
2.6.	Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)	58
2.7.	Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)	59
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>		
1.	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS CLARIFICADOS	60
2.	EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS: ENSAYOS DE INHIBICIÓN PROTEOLÍTICA	60
2.1.	Actividad inhibitoria de CPA	60
2.2.	Curva dosis repuesta del EC	61
3.	PERFIL PROTEICO DEL EC MEDIANTE SDS-PAGE	62
4.	PURIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS INHIBIDORES. TRATAMIENTO TÉRMICO	63

4.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de CPA frente a cada tratamiento térmico	65
5. ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI/TOF DEL EC Y LAS MUESTRAS TRATADAS TÉRMICAMENTE	66
6. ENSAYO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA AL EXTACTO CRUDO Y A CADA TRATAMIENTO TÉRMICO	67
REFERENCIAS	68
CONCLUSIONES GENERALES	73



# Capítulo 1



# INTRODUCCIÓN



## 1. HIPERTENSIÓN

### 1.1. Relevancia de ésta enfermedad a nivel poblacional

Los problemas de salud a nivel mundial han incrementado ya que casi 17 millones de personas mueren anualmente a causa de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial, índice de colesterol elevado, diabetes, el estilo de vida (obesidad, falta de actividad física, mala nutrición, tabaquismo), y la pobreza (World Health Organization 2002).

En La República Argentina, las cifras también están aumentando con respecto a éste tipo de enfermedades, principalmente en el caso de la hipertensión arterial. Según cifras manejadas por autoridades sanitarias, cada año 40.000 personas sufren infartos en nuestro país. En el mismo lapso, entre 70.000 y 80.000 padecieron un accidente cerebrovascular. Mientras tanto, el 30,5% de las muertes registradas en la Provincia de Buenos Aires tienen que ver con enfermedades cardiovasculares.

El estudio Argentina Registro Nacional de Stroke, concebido en la ciudad de La Plata y realizado por el Concejo Nacional de Stroke de la Sociedad Argentina de Cardiología estableció que el 80% de los infartos cerebrales se vinculan a la hipertensión arterial mal controlada o sin controlar (Diario El Día 2011).

### 1.2. Sistema renina - angiotensina

Clásicamente el control de la presión sanguínea ha sido asociado con el sistema renina - angiotensina, el cual juega un importante control en la regulación de la presión arterial.

La renina convierte el angiotensinógeno del hígado en un decapeptido (angiotensina I) el cual luego es clivado proteolíticamente y convertido en el octapeptido activo angiotensina II por acción de la enzima convertidora de angiotensina (ECA). Esta enzima es expresada en el endotelio vascular, principalmente en los pulmones (Hong et al., 2008). La ECA retira, además, de

forma secuencial, dos péptidos carboxiterminales en la estructura de la bradikinina, e inactiva ésta molécula vasodilatadora.

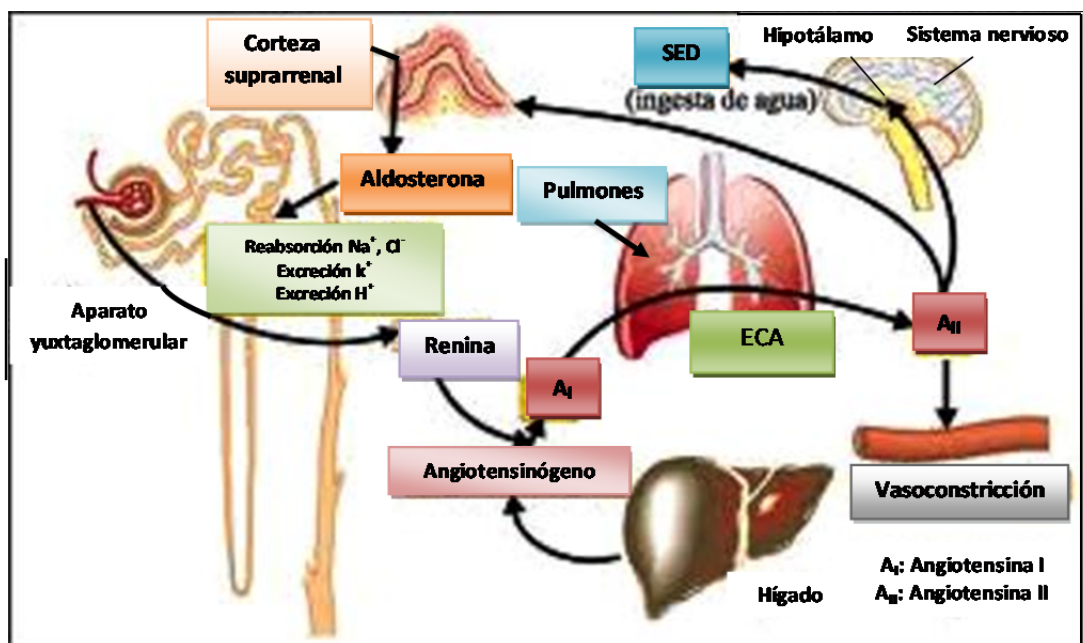


Figura 1. Sistema renina-angiotensina

La ECA estructuralmente es una metalopeptidasa que requiere  $Zn^{+}$  y  $Cl^{-}$  como cofactor para su activación (Contra, Estrada, Chávez, & Hernández, 2008).

Como se muestra en la Fig.1 la angiotensina II (AG II) posee varias acciones importantes, como el incremento de la presión arterial, aumento del sodio y la retención de fluidos. AG II actúa a través de al menos dos clases de receptores, los receptores AT-1 y AT-2. La mayoría de los efectos fisiológicos de la AG II son mediados a través de los receptores AT-1, mientras que los receptores AT-2 se expresan principalmente durante el periodo fetal y se asocian con la diferenciación y regeneración celular. De éste modo se cree que la inhibición de la ECA o de los receptores AT 1 contribuiría a disminuir la presión sanguínea. Actualmente, el sistema renina - angiotensina se ha convertido en la clave para combatir la hipertensión (Hong et al., 2008).

### 1.3. ECA como diana de las terapias contra la hipertensión

Los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina son una clase de medicamentos que se emplean principalmente en el tratamiento de la hipertensión arterial. Las sustancias inhibidoras ECA se descubrieron por primera vez en venenos de serpientes. Más tarde varios inhibidores de ECA fueron aislados en péptidos encriptados en proteínas alimentarias mediante hidrólisis enzimática (Pihlanto-Leppälä, 2001).

Los inhibidores de ECA más importantes utilizados para tratamientos son el captopril, el enalapril, el lisinopril y el ramipril. El captopril (Fig. 2) fue la primera molécula sintetizada por variación estructural a partir de la molécula original de angiotensina I y del receptor de la ECA. Esta molécula mimetiza la forma de los dos últimos restos peptídicos de la angiotensina I, lo que permite su unión con los centros de anclaje de la molécula original por lo que bloquea el centro activo de la enzima al sustituir el enlace peptídico diana (enlace N-C) por un enlace C-C que requiere una energía de activación más elevada. Esta unión es irreversible.

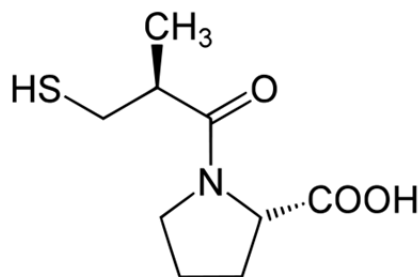


Figura 2. Captopril

## 2. ALIMENTOS FUNCIONALES Y NUTRACEUTICOS

Un nutraceutico es cualquier sustancia alimenticia o parte de un alimento que provee beneficios médicos o de la salud, incluyendo la prevención y el tratamiento de enfermedades. Corresponde hacer una distinción entre los nutraceuticos que mejoran la salud actuando en la prevención de aquellos utilizados para el tratamiento de enfermedades que contienen compuestos farmacológicamente activos. Los nutraceuticos utilizados en prevención son

ingredientes adecuados de los alimentos funcionales. Un alimento fisiológicamente funcional se define como un derivado de sustancias naturales que pueden y deben consumirse como parte de la dieta diaria; actuando como reguladores al afectar un proceso particular del organismo cuando son ingeridos. Por otro lado los alimentos funcionales no deben confundirse con productos médicos alimenticios diseñados para suplir un nutriente o para el tratamiento de pacientes que sufren enfermedades relacionadas con la dieta (Meisel, 1997).

### 3. PEPTIDOS BIOACTIVOS

Las proteínas representan uno de los componentes principales de los alimentos, tanto desde el punto de vista funcional como nutricional. Aparte de su función básica, son reservorio de péptidos que regulan los procesos vitales de los organismos. Por lo tanto, actualmente son consideradas como fuente de péptidos biológicamente activos (Möller, Scholz-Ahrens, Roos, & Schrezenmeir, 2008).

#### 3.1. Definición

Los péptidos bioactivos son secuencias de aminoácidos de pequeño tamaño, entre 2 y 15 residuos, intactas dentro de la proteína pero que pueden ser liberados *in vivo* por acción de enzimas gastrointestinales o bien *in vitro* con enzimas específicas, o durante los procesos de elaboración de determinados alimentos (Korhonen & Pihlanto, 2006; Pihlanto-Leppälä, 2001; Villadóniga et al., 2009). Estos fragmentos específicos de proteína potencialmente actúan como moduladores fisiológicos del metabolismo durante la digestión intestinal. Muchos péptidos bioactivos han sido identificados, pero debe hacerse una distinción entre las proteínas bioactivas presentes naturalmente en los alimentos como los factores de crecimiento o las inmunoglobulinas presentes en la leche y los péptidos que se generan durante la digestión de fuentes proteicas intactas, o por el uso de hidrolizados de proteína como componentes de un sistema alimentario formulado (Villadóniga et al., 2009).



### 3.2. Fuentes de péptidos bioactivos

Según estudios recientes, la leche bovina, quesos y productos lácteos parecen ser una de las fuentes de mayor cantidad de péptidos bioactivos derivados de productos alimenticios. Esto puede deberse a los efectos particulares que tiene la leche en la nutrición de una persona durante los primeros meses de vida.

Los péptidos bioactivos son obtenidos además de otras fuentes de animales y vegetales. En la sangre bovina, gelatina, carne, huevos, varias especies de peces como atún, sardina y salmón como así también a partir de proteínas de trigo, maíz, soja, arroz, calabaza y sorgo han sido detectados luego de liberarse mediante hidrólisis o fermentación (Möller et al., 2008).

### 3.3. Liberación de péptidos encriptados en proteínas

Existen tres formas en las que los péptidos encriptados en la secuencia aminoacídica de las proteínas pueden liberarse:

1. *In vivo* durante la digestión debido a la acción de enzimas digestivas como la tripsina.
2. *In vivo* durante la digestión por enzimas microbianas presentes en el tracto gastrointestinal.
3. *In vitro* durante el procesamiento o maduración de alimentos por enzimas aisladas o presentes en microorganismos, por ejemplo durante la fermentación de leche por cultivos iniciadores ("starter") en la producción de quesos (Korhonen & Pihlanto, 2006; Möller et al., 2008).

### 3.4. Efectos de los péptidos bioactivos

Se han descripto numerosas actividades biológicas de péptidos liberados a partir de proteínas alimentarias mediante proteólisis enzimática. Entre éstas actividades encontramos péptidos con actividad opioide, antitrombótica, péptidos inmunomoduladores, péptidos inhibidores de la enzima convertora de

angiotensina, péptidos con actividad antioxidante, con actividad antimicrobiana, entre otras (Meisel, 1997; Pihlanto-Leppälä, 2001; Torruco-Uco et al., 2008).

- ◆ **Péptidos con actividad opioide:** El aislamiento por primera vez en 1975 de péptidos opioides endógenos, denominados encefalinas, condujo a la detección en 1979 de la actividad opioide de péptidos derivados de leche. Estos péptidos son pequeños, de entre 5 y 10 aminoácidos de longitud. Los más abundantes son las  $\beta$  - casomorfina, denominados así por derivar de la hidrólisis de  $\beta$  - caseína y por su parecido efecto fisiológico al de la morfina (Vioque et al., 2000). Los efectos fisiológicos de éstos péptidos dependen del tipo de receptor, los receptores  $\mu$  están vinculados con el control de la motilidad intestinal y comportamiento emocional, los receptores  $\sigma$  relacionados con el control del comportamiento emocional, mientras que los receptores  $\kappa$  están relacionados con analgesia y saciedad (Pihlanto-Leppälä, 2001).
- ◆ **Péptidos con actividad antitrombótica:** Péptidos derivados del extremo C-terminal de la  $\kappa$  - caseína bovina han presentado actividad antitrombótica, ya que presentan actividad inhibidora de la agregación de plaquetas así como también de la unión de la cadena  $\gamma$  del fibrinógeno humano a receptores específicos de plaquetas (Vioque et al., 2000).
- ◆ **Péptidos inmunomoduladores:** Se ha observado que péptidos derivados de la hidrólisis de  $\alpha$  y  $\beta$  -caseínas son capaces de estimular la fagocitosis de eritrocitos por macrófagos del peritoneo así como ejercer un efecto protector frente a infecciones causadas por *Klebsiella pneumoniae* tras su administración intravenosa en ratones. Así mismo se ha descrito que la secuencia C- terminal de la  $\beta$  - caseína de vaca induce una proliferación significativa de linfocitos de ratas (Vioque et al., 2000).

- ◆ **Péptidos inhibidores de la enzima convertora de angiotensina:** La enzima convertora de angiotensina (ECA) juega un papel fundamental en la regulación de la presión sanguínea. Dentro del sistema renina - angiotensina, la ECA cataliza la conversión de angiotensina I en angiotensina II, un octapéptido que produce vasoconstricción y por tanto aumenta la presión arterial. Además, ECA degrada la bradiquinina (vasodilatadora). De éste modo, la inhibición de ECA reduce la hipertensión y se cree que previene enfermedades cardiovasculares (Chen et al., 2009; Möller et al., 2008).
  
- ◆ **Péptidos con actividad antioxidante:** Se ha encontrado que varios péptidos provenientes de proteínas alimentarias poseen capacidad antioxidante. Estos péptidos están formados por 5 a 16 residuos aminoacídicos. Son considerados componentes beneficiosos para la salud de bajo costo, alta actividad y fáciles de absorber. Presentan además buenas propiedades nutricionales.  
  
El mecanismo específico por el cual éstos péptidos llevan a cabo su actividad antioxidante no ha sido completamente dilucidado, aunque varios estudios han demostrado que son inhibidores de la peroxidación de lípidos, secuestradores de radicales libres y quelantes de iones metálicos (Sarmadi & Ismail, 2010).
  
- ◆ **Péptidos con actividad antimicrobiana:** Se han estudiado péptidos con actividad antimicrobiana que actúan contra bacterias, hongos o virus. Gagnaire y col. (2001) han detectado actividad antimicrobiana en péptidos producidos durante la maduración de queso Emmental, debido a la hidrólisis de  $\alpha$  s1 y  $\beta$  caseína. Asimismo se han obtenido péptidos con ésta actividad a partir de proteínas del huevo y de la hemoglobina bovina (Di Bernardini et al., 2011).

### 3.5. Biodisponibilidad y sitios de acción.

Las proteínas y péptidos de la dieta están sujetos a cambios drásticos en su estructura durante los procesos de digestión. La proteína ingerida es primero hidrolizada por varias proteinasas en el tracto gastrointestinal para producir oligopéptidos, alguno de los cuales pueden ser biológicamente activos, mientras que algunas proteínas resisten a la hidrólisis permaneciendo intactas en el tracto. Algunos de los oligopéptidos son digeridos hasta aminoácidos por peptidasas que se encuentran en el borde en cepillo de las células epiteliales, mientras que otros permanecen sin ser hidrolizados (Torruco-Uco et al., 2008).

Bien se sabe que los di- y tripéptidos son fácilmente absorbidos en el intestino, sin embargo hay poca información sobre la absorción de péptidos bioactivos de mayor tamaño. Para poder ejercer sus efectos los péptidos deben absorberse desde del intestino y alcanzar las células blanco en concentraciones adecuadas (Möller et al., 2008).

Los di y tri – péptidos pueden ser absorbidos en forma intacta atravesando la membrana intestinal con ayuda de un sistema de transportadores peptídicos específicos. Cabe mencionar que las proteínas y péptidos pueden también ser transportados en forma pasiva a través de la vía paracelular – ruta de transporte no degradativa (Möller et al., 2008; Torruco-Uco et al., 2008).

## 4. PÉPTIDOS INHIBIDORES DE LA ENZIMA CONVERSORA DE ANGIOTENSINA

### 4.1. Aplicación potencial en alimentos funcionales o productos médicos

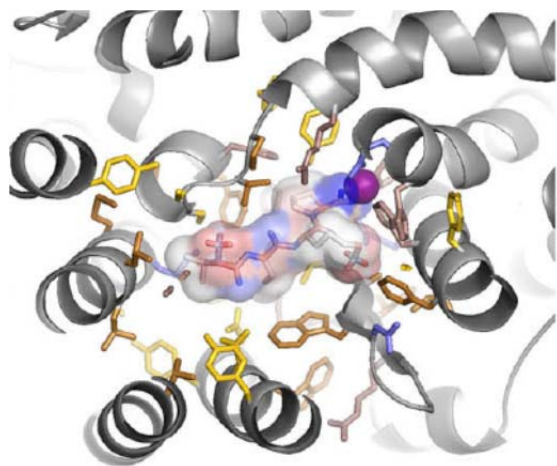
Los potenciales beneficios de los péptidos bioactivos de proteínas lácteas y su aplicación en alimentos funcionales son objeto de interés creciente. Los péptidos inhibidores de ECA y con actividad antihipertensiva (*in vivo*) son una alternativa para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión arterial. Aunque el tratamiento de éste padecimiento se ha llevado a cabo con medicamentos sintéticos como el Captopril, Enalapril, entre otros, éstos

fármacos pueden presentar ciertas reacciones secundarias como tos y pérdida de sentido del gusto (Torruco-Uco et al., 2008), por lo que actualmente se está prestando mayor atención a los componentes bioactivos de fuentes naturales que tengan un efecto antihipertensivo sobre el organismo humano.

Aún cuando muchos péptidos no son liberados bajo condiciones fisiológicas *in vivo*, ellos podrían ser producidos comercialmente y usados como nutracéuticos (Oliva & Vega, 2004).

#### 4.2. Mecanismo de acción

La ECA elimina dos aminoácidos del extremo C-terminal de la angiotensina I para formar el octapéptido angiotensina II. La inhibición de ésta enzima puede influir en diferentes sistemas reguladores del organismo.



**Figura 3.** Modo de unión de ECA con un péptido inhibidor. Las cadenas laterales cercanas a 7 Å del ligando se muestran en modelo de varillas coloreados según el tipo de péptido: polar (amarillo), hidrofóbico (marrón), ácido (rosa) y básico (azul). El átomo de  $Zn^{2+}$  se encuentra coloreado de púrpura. El ligando se muestra en ambos modelos de varillas y de superficie. El ligando interactúa con el ión  $Zn^{2+}$  a través de los grupos cargados negativamente. Tomado de Vecchi and Añón 2009.

Las correlaciones estructura – actividad entre diferentes péptidos indican que la secuencia C-terminal del sustrato influye en el enlace a la ECA. Los péptidos C-

terminal pueden interactuar con los sitios S1 y S2 del sitio activo de la ECA (Oliva & Vega, 2004). En la Fig. 3 se muestra la interacción de un péptido proveniente de la globulina 11S del amaranto (Vecchi & Añón, 2009)

#### 4.3. Fuente de péptidos con actividad inhibitoria de la enzima convertora de angiotensina

Se han obtenido péptidos inhibidores de ECA a partir de proteínas de distintos alimentos de origen animal y vegetal. Los principales son péptidos provenientes de proteínas lácteas. Estos péptidos, como ya mencionamos, pueden producirse por hidrólisis de las proteínas lácteas con diferentes enzimas (por ejemplo proteinasas gastrointestinales enriquecidas en pepsina, tripsina y quimotripsina), y también por fermentación de la leche con distintas bacterias (Hong et al., 2008).

A pesar de que el huevo es un alimento fundamental en la nutrición humana,, muy pocos estudios han observado la producción de péptidos bioactivos a partir de proteínas del mismo (Torruco-Uco et al., 2008). Los péptidos con actividad inhibitoria de ECA aislados del huevo, pueden ser obtenidos por hidrólisis enzimática de la ovoalbúmina, incluyendo la ovoquinina, utilizando enzimas como tripsina, quimotripsina y pepsina (Hong et al., 2008).

Se han descripto también péptidos inhibidores de ECA en proteínas de pescado y levaduras, así como en proteínas de maíz y de arroz (Vioque et al., 2000).

## 5. LECHE COMO FUENTE DE PÉPTIDOS BIOACTIVOS

### 5.1. Composición de la leche

La leche es un líquido de color blanco opaco con una composición compleja; su sabor es suave y posee un pH cercano a la neutralidad. La materia grasa se encuentra en forma de emulsión, las proteínas constituyen una suspensión, mientras que los restantes componentes (lactosa, otras sustancias nitrogenadas, minerales, etc) están disueltos. Las caseínas constituyen el 78,2% de las proteínas

totales, mientras que las proteínas del suero representan alrededor del 17% y el porcentaje restante incluye hormonas y enzimas (Taverna, 2002).

Las proteínas del lactosuero se definen como aquellas que se mantienen en solución tras precipitar las caseínas a pH 4,6 a una temperatura de 20°C. Entre éstas se encuentran proteínas de origen mamario tales como la  $\alpha$ -lactalbúmina, la  $\beta$ -lactoglobulina (las cuales representan el 70 % de las proteínas del lactosuero) y la lactoferrina. A la vez están presentes proteínas de origen sanguíneo tales como la albúmina y las inmunoglobulinas.

Las propiedades funcionales del lactosuero vienen dadas por la  $\alpha$ -lactalbúmina y  $\beta$ -lactoglobulina, destacándose su solubilidad, sus propiedades emulsionantes y espumantes y su capacidad de gelificación.

**Tabla 1.** Proteínas del lactosuero de la leche bovina (según datos de Alais, 1985).

Proteínas lactosuero	Valor relativo (%)
$\beta$ -lactoglobulina	51
$\alpha$ -lactoalbúmina	22
Suero-albúmina	5
Globulinas inmunes	12
Proteosa-peptona *	10

\* Algunas fracciones de este grupo se consideran parte de las caseínas (Ginger & Grigor, 1999)

## 5.2. Péptidos bioactivos obtenidos a partir de proteínas de la leche

En 1979 se descubrió por primera vez la presencia de péptidos bioactivos en la secuencia aminoacídica de las proteínas lácteas. Aunque otras proteínas, tanto de origen animal como vegetal, contienen secuencias biológicamente activas, la leche constituye la principal fuente de estos péptidos.

Las proteínas lácteas son conocidas por tener propiedades nutricionales, funcionales y biológicas que hacen de ellas ingredientes importantes en alimentos funcionales promotores de la salud. Estas propiedades son parcialmente atribuidas a los péptidos bioactivos codificados en las diferentes proteínas de la leche.

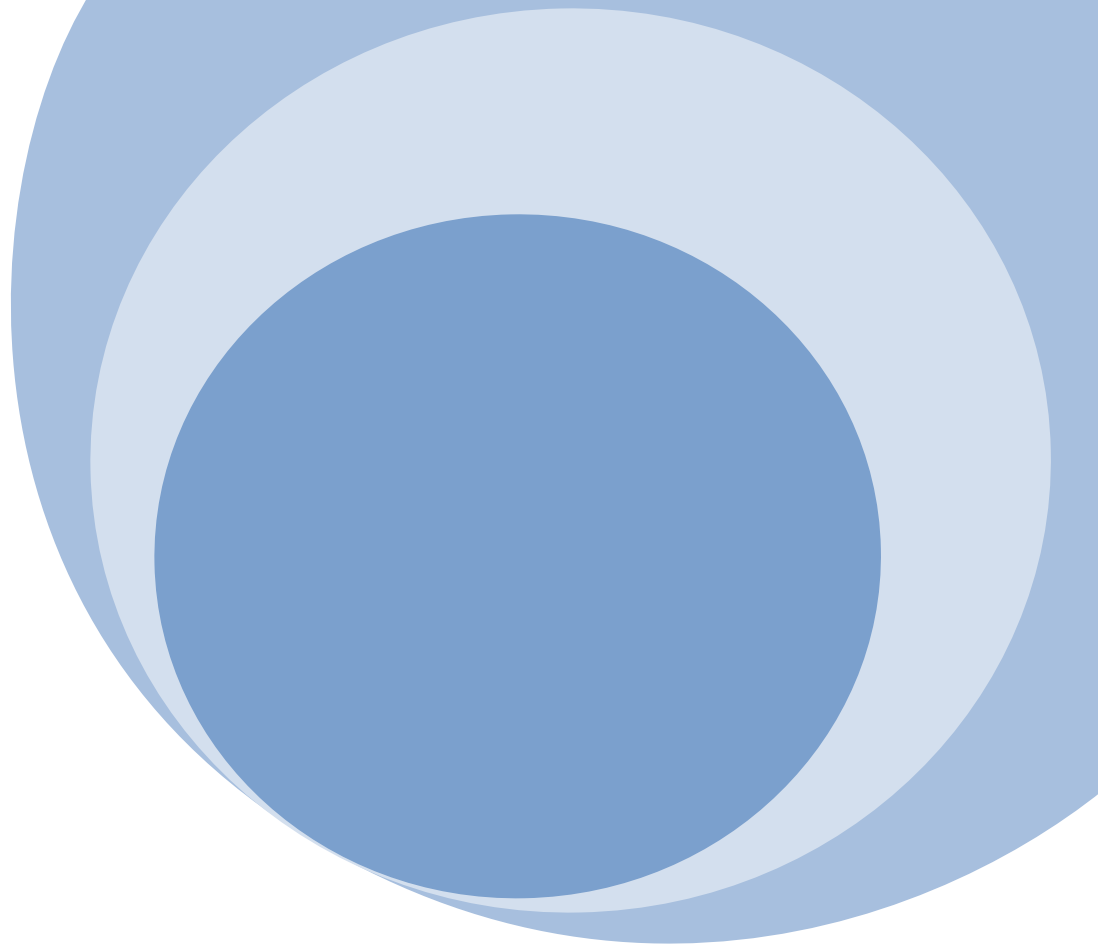
Muchas proteínas constituyen fuentes de péptidos inhibidores de la ECA, como por ejemplo las caseínas bovinas, cuyos fragmentos son conocidos como casoquininas. Otras proteínas lácteas también dan origen a péptidos con propiedades inhibitorias, tal es el caso de la  $\beta$ -lactoglobulina y la  $\alpha$ -lactoalbúmina (Oliva & Vega, 2004; Pihlanto-Leppälä, 2001).

Se han encontrado varios péptidos inhibidores de ECA mediante hidrólisis de leche con una peptidasa de *Lactobacillus helveticus*. Los péptidos más estudiados son Val-Pro-Pro (VPP) e Ile-Pro-Pro (IPP) (Korhonen, 2009; Korhonen & Pihlanto, 2006; Möller et al., 2008). La administración de Calpis™, un producto de leche fermentada por *L. helveticus* y *Saccharomyces cerevisiae* conteniendo ambos tripéptidos, a ratas resultó en la disminución de la presión sanguínea. Además, ha sido reportado que el péptido inhibidor de ECA, VPP, atraviesa la membrana de las células CaCo-2 en monocapa (modelo para el estudio del transporte de fármacos a través de la mucosa intestinal) en una cantidad significativa y se ha propuesto que el mecanismo de transporte es por vía paracelular (Möller et al., 2008)



*Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:*

- a) Obtener preparaciones enzimáticas crudas de látex de Araujia hortorum Fourn como fuente de peptidasas cisteínicas.*
- b) Obtener hidrolizados parciales de proteínas de suero lácteo bovino con actividad biológica potencialmente adecuados como ingredientes de alimentos funcionales.*
- c) Caracterizar los hidrolizados en base a su grado de hidrólisis.*
- d) Analizar los perfiles de degradación de los hidrolizados proteicos mediante electroforesis y HPLC.*
- e) Aislar y purificar los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados.*
- f) Determinar la actividad inhibitoria de la Enzima Conversora de Angiotensina de los hidrolizados y los péptidos aislados.*



# MATERIALES Y MÉTODOS

## 1. MATERIAL VEGETAL



**Figura 1.** Frutos y hojas de *Araujia hortorum*

Para la extracción de proteasas se utilizaron frutos de *Araujia hortorum* Fourn. como el que se muestra en la Fig. 1. La planta pertenece a la familia **Apocynaceae** (Tabla 1), dicotiledóneas que incluyen árboles, arbustos, hierbas, o lianas. Muchas especies son grandes árboles que se encuentran en la selva tropical, la mayoría proceden de los trópicos y subtrópicos. Algunas son hierbas perennes de la zona templada. Estas plantas tienen látex, muchas especies son venenosas si se ingieren.

Los laticíferos de esta familia se caracterizan por presentar gran cantidad de proteasas, resinas, gomas y mucílagos, entre otros componentes.

*A. hortorum* es una enredadera con hojas ovado triangulares, pecioladas, obtusas en la base, enteras, glabras en el haz y albo-tomentosas en el envés, de 4-9 cm de longitud. Las flores poseen corola color blanco o rosado de 15 mm de largo.

Los frutos fueron obtenidos a partir de plantas crecidas en la localidad de Ringuelet, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se trata de folículos ovoideos de 14 cm de longitud, verdes, lisos y glabros (Dimitri, 1978).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la familia Apocynaceae

Clasificación taxonómica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocynaceae

Subfamilia:	Apocynoideae Asclepiadoideae Periplocoideae Rauvolfioideae Secamonoideae
-------------	--

Esta especie es autóctona y se la conoce con los nombres vulgares de “tasi” o “doca”.

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Obtención de las preparaciones enzimáticas

El látex de la especie estudiada, del cual se extraerán las proteasas, se obtuvo practicando incisiones superficiales en los frutos objeto de estudio y fue colectado sobre buffer cítrico-fosfato 0,1 M, pH 6,4, conteniendo EDTA y cisteína 5mM. El EDTA se agregó para impedir la acción de fenoloxidasas, que poseen  $\text{Cu}^{2+}$  en su centro activo (Anderson, 1968) y la cisteína para mantener el medio reductor, evitando de este modo la oxidación de los sitios catalíticos de las proteasas. Se utilizó un buffer con valor de pH alejado del pH óptimo de las peptidasas presentes en la muestra, a fin de minimizar la autodigestión durante los procesos de extracción enzimática.

La suspensión resultante fue centrifugada diferencialmente a  $2884 \times g$  durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$  y luego ultracentrifugada a  $37492 \times g$ . El sobrenadante resultante, conteniendo la proteína de interés, fue denominado "*extracto crudo*" (EC). Este fue fraccionado y conservado a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de ser utilizado en estudios posteriores.

### 2.2. Determinación del contenido de proteínas

#### 2.2.1. Método de Bradford

Para determinar la concentración de proteínas del extracto crudo se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Este método es aconsejado para extractos vegetales que suelen contener sustancias de naturaleza fenólica, permitiendo la

valoración de proteínas sin que esas sustancias interfieran, tal como sucede cuando se utiliza el clásico método de Lowry (Peterson, 1979), donde estos compuestos fenólicos modifican los valores de absorbancia.

El mecanismo implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas, unión que produce un corrimiento del máximo de absorbancia de 465 nm (forma roja del colorante libre) a 595 nm (forma azul del complejo colorante-proteína). Las lecturas de absorbancia se realizaron a esta última longitud de onda en un espectrofotómetro Agilent 8453 E (Agilent Technologies). Se utilizó albúmina bovina (Sigma Chemical Co) como proteína patrón.

#### 2.2.1.1. *Método estándar (macrométodo)*

Se mezclaron 50  $\mu$ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 min se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 100-1000  $\mu$ g de proteína/ml.

#### 2.2.1.2. *Micrométodo*

Se mezclaron 250  $\mu$ l de muestra con 2,5 ml de reactivo, se agitó en vórtex y a los 10 minutos se leyó la absorbancia a 595 nm. El rango de detección de proteína de este método es de 10-100  $\mu$ g de proteína/ml.

Tanto los ensayos con la muestra problema como los blancos de reactivo se realizaron por triplicado.

### 2.2.2. *Método de Lowry*

Este método se basa en la reacción del reactivo de Folin-Ciocalteu con las proteínas. Si bien el mecanismo de reacción no está bien dilucidado, se sabe que la tirosina, y en menor medida la cisteína, la cistina, la histidina y las uniones peptídicas, reaccionan reduciendo al molibdato a azul de molibdeno. La reacción también puede producirse en presencia de tungstato, para generar azul de

molibdeno y tungsteno. El complejo da un color azul característico que se mide a 745-750 nm. Los iones  $\text{Cu}^{2+}$  en medio alcalino facilitan la reacción de reducción del reactivo de Folin formando un complejo con la unión peptídica a través del nitrógeno involucrado en el enlace y reduciéndose a  $\text{Cu}^{1+}$ . El  $\text{Cu}^{1+}$  y los residuos involucrados reducen entonces al reactivo de Folin generando el color característico.

El rango de detección de proteína de este método es de 50-400  $\mu\text{g}$  de proteína/ml.

#### 2.2.2.1. Reactivos

Solución A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en NaOH 0,1N

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1,0%

Tartrato de Na y K 2,0%

Solución de Folin: Reactivo de Folin Ciocalteau diluido con agua destilada 1:1

#### 2.2.2.2. Determinación

Se mezclaron en el momento de la determinación volúmenes iguales de la solución de  $\text{CuSO}_4$  y del tartrato (*solución B*). Se añadieron 1ml de la *solución B* a 50 ml de la *solución A*, para obtener la solución A+B.

Se preparó la dilución de la muestra que corresponda (200  $\mu\text{l}$ ) a la que se le adiciona 1ml de solución A+B. Se agitó bien y se dejó reposar 10 min.

Pasado este tiempo se agregaron 100  $\mu\text{l}$  del reactivo de Folin diluido. Se agitó y se dejó reposar 30 min. Se determinó la absorbancia a 750nm.

Para la curva de calibración se utilizó seroalbúmina bovina (Sigma Chemical Co) en el rango de 1 mg/ml.

Todos los ensayos realizaron por triplicado.

### 2.3. Actividad peptidásica

Los ensayos de actividad proteolítica fueron realizados utilizando caseína tipo Hammarsten (Research Organics, Cleveland, OH) como sustrato. Las soluciones para los ensayos de actividad caseinolítica se prepararon como se indica a continuación:

Solución de caseína al 1 % (p/V):

Caseína	1 g
Tris 0,05 M, pH 8,0	80 ml
20 minutos en baño de María con agitación ocasional	
Filtración en caliente	
L-cisteína	88 mg
EDTA	186 mg
Tris 0,05 M, pH 8,0	c.s.p. 100 ml

Solución de ácido tricloroacético 5 % (p/V): 5 ml de solución acuosa 100 % de ácido tricloroacético (TCA) se llevaron a 100 ml finales con agua destilada.

### 2.3.1. Ensayo de actividad caseinolítica

Se mezclaron 100 µl de solución enzimática y 1,1 ml del sustrato de caseína al 1 % en un tubo de ensayo colocado en un baño termostatzado a 37 °C. La reacción se detuvo por el agregado de 1,8 ml de TCA al 5 %, los tubos se mantuvieron en frío 30 minutos para lograr una mejor precipitación del sustrato no hidrolizado. Luego se centrifugaron a  $2884 \times g$  durante 20 minutos y se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 280 nm (Abs<sub>280</sub>). Cada ensayo se realizó por quintuplicado.

Para cada experimento se preparó el correspondiente blanco, mezclando 0,1 ml de solución enzimática, 1,8 ml de TCA al 5 % y 1,1 ml caseína al 1 %, en ese orden. De esta manera se aseguró la inhibición de la enzima antes del agregado del sustrato. Los blancos se realizaron por triplicado.

#### 2.3.1.1. Cálculo de la actividad caseinolítica

La actividad proteolítica se determinó según la ecuación:

$$U_{cas} = \frac{A_{280}}{t \times V} \times Fd$$

donde Ucas (unidad de actividad caseinolítica) se define como la variación en unidades de absorbancia que produce 1 ml de solución enzimática, debido a los

productos de digestión de la caseína solubles en ácido tricloroacético al 5 % (m/V), por minuto, a 37 °C en el buffer de reacción al pH indicado (Priolo *et al.*, 1991).

t = tiempo de duración del ensayo de actividad en minutos.

V = volumen de la solución enzimática ensayada en ml.

Fd = factor de dilución de la solución enzimática.

## 2.4. Obtención de hidrolizados proteicos

El sustrato empleado en los ensayos de hidrólisis fue un concentrado de proteínas (80%) de suero lácteo bovino comercial (Lacprodan 80, Arla Foods Ingredients S. A.)

### 2.4.1. Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino en función del tiempo de reacción

A fin de optimizar el ensayo, la primera variable a ajustar fue el tiempo de hidrólisis. El concentrado proteico se disolvió (10 g/l) en agua destilada (pH final: 6,90). Se utilizó una dilución 1/20 en agua destilada de las proteasas presentes en el EC de *Araujia hortorum*.

En varios viables eppendorf colocados en baño de agua a 40 °C se vertieron 100 µl del EC y 400 µl de sustrato. Se dejó transcurrir la hidrólisis el tiempo necesario (0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 180 minutos). Se detuvo la reacción por el agregado de 500 µl de ácido tricloroacético (TCA) al 5%. Para el blanco de sustrato se colocó agua destilada en lugar de la preparación enzimática. Seguidamente se centrifugó durante 15 minutos a 5000 x g en centrifuga Hermle Z323K. El precipitado obtenido se dejó secar en desecador conectado a una bomba de vacío durante aproximadamente 15 minutos; luego de lo cual se resuspendió en 450 µl de buffer de muestra (ver sección 2.4.3.)



Finalmente se llevó a ebullición 15 min, se centrifugó a  $5000 \times g$  durante 15 min y se transfirió el sobrenadante con mucho cuidado a otro vial eppendorf.

#### 2.4.2. Optimización del método para detener la reacción de hidrólisis

Una vez estipulado los tiempos de reacción, se procedió a optimizar las condiciones de hidrólisis realizando ensayos en pequeña escala. Las mezclas de reacción consistieron en 90  $\mu$ l de EC y 3,6 ml de sustrato termostatizados a 40 °C. Todos los ensayos se realizaron por cuádruplicado. Se ensayaron distintas condiciones para detener la reacción:

- ◆ shock térmico a temperatura de ebullición durante 5min;
- ◆ cambio de pH mediante agregado de HCL 0,1 N;
- ◆ ultrafiltración en tubos Millipore con membrana con corte de 3000Da.

En el primer ensayo, luego de transcurrido el tiempo de hidrólisis, se colocó la mezcla en baño termostático a 100 °C durante 5 minutos. Se tomaron muestras de los productos de hidrólisis antes de detener la reacción y luego del shock térmico. Los controles que se realizaron, en las mismas condiciones de ensayo, fueron un blanco de enzima, colocando agua en lugar de EC, y un segundo blanco inactivando el extracto enzimático por shock térmico durante 5 minutos previo al ensayo de hidrólisis.

Finalmente se ultrafiltró la mezcla de hidrólisis utilizando dispositivos de ultrafiltrado por centrifugación (Millipore) con una membrana de corte de 3000 Da en una centrífuga refrigerada Hermle Z323K durante 20 min, con el objeto de separar los péptidos producto de la hidrólisis enzimática de las proteínas.

Para el segundo método propuesto se realizó el ensayo en idénticas condiciones y se adicionaron ácido gotas de HCl 0,1 N con pipeta Pasteur en cantidad necesaria para descender el pH a 4,5, un valor lejano al pH óptimo de la enzima. Finalmente

se ultrafiltró la mezcla como se describió para el primer ensayo. Paralelamente se siguió la absorbancia (Abs) a 280 nm en un ensayo control para verificar si las enzimas del EC mantenían su actividad luego de la adición de ácido. Se tomaron muestras a 0, 30, 60 y 90 minutos.

En el tercer y último ensayo, una vez transcurrido los tiempos de hidrólisis (20 min y 180 min), se procedió a ultrafiltrar rápidamente la mezcla con membrana de corte de 3000 Da utilizando una centrífuga refrigerada. La centrifugación se realizó a  $1413 \times g$ , a  $8^{\circ}\text{C}$ , durante aproximadamente 30 min (hasta alcanzar el 50% del volumen del concentrado peptídico).

Simultáneamente en todos los casos se realizó un ensayo blanco de sustrato agregando 90  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada en lugar de la enzima.

A mayor escala, la hidrólisis se realizó en vaso de precipitados de 50 ml termostatzado a  $40^{\circ}\text{C}$ . Cada mezcla de reacción consistió en 450  $\mu\text{l}$  de EC y 18 ml del sustrato.

Los péptidos resultantes de la ultrafiltración se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  para realizar ensayos posteriores.

### 2.4.3. Análisis electroforético

A fin de seleccionar el mejor método de detención de la hidrólisis se analizó el perfil electroforético de las muestras.

#### 2.4.3.1. Electroforesis desnaturizante discontinua en geles de poliacrilamida al 14% y al 20%

##### 2.4.3.1.1. Preparación de las muestras

Las muestras a ser sometidas a SDS-PAGE se colocaron en tubos eppendorf conteniendo buffer de muestra con SDS y sin  $\beta$ -mercaptoetanol. Luego se les adicionó  $\beta$ -mercaptoetanol y se las calentó nuevamente durante 5 min. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a  $5.000 \times g$  durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$

en una centrífuga Hermle Z 323 K utilizando un rotor 22087 V01. Cuando las muestras se calientan en exceso de SDS y un reactivo tiólico, como el  $\beta$ -mercaptoetanol, la mayoría de los polipéptidos unen el SDS en una relación constante que depende de la masa, de tal forma que la densidad de carga es idéntica y migran en los geles de acuerdo a su tamaño, lo que permite determinar la masa molecular de los polipéptidos separados.

---

**Buffer de muestra**

Tris	0,787 g
Glicerol	8 ml
SDS	2 g
$\beta$ -mercaptoetanol	5 ml
Azul de bromofenol	2 mg
Se lleva a pH 6,8 con HCl 1 N	
Agua c.s.p.	100 ml

---

#### 2.4.3.1.2. Preparación de los geles

Los geles se moldearon empleando el soporte provisto con el equipo Mini-Protean III (Bio-Rad), en placas de vidrio de 7 cm x 8 cm y separadores de 0,75 mm de espesor. En un primer paso se dejó polimerizar el gel de resolución y luego se hizo lo propio con el gel de “stacking”.

La composición de las soluciones necesarias para la preparación de los geles se describe a continuación.

**Solución madre de Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)**

Acrilamida	30 g
Bisacrilamida	0,8 g
Agua destilada c.s.p.	100 ml

Esta solución, luego de filtrada, se conservó hasta 2 meses en frasco color caramelo a 4°C.

**Buffer del gel de resolución**

Tris	36,3g
Se lleva a ph 8,8 con HCl 1 N	
Agua c.s.p.	100 ml

**Gel de resolución 14%**

Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	3,5 ml
Buffer del gel de resolución 3M	0,94 ml
SDS 10%	75 µl
Agua destilada	2,61ml
Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes	
TEMED	4 µl
Persulfato de Amonio 1,5% p/v	0,375 ml

**Gel de resolución 20%**

Acrilamida-Bisacrilamida (30:0,8)	5,0 ml
Buffer del gel de resolución 3M	0,94 ml
SDS 10%	75 µl
Agua destilada	1,18 ml
Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes	
TEMED	4 µl
Persulfato de Amonio 1,5% p/v	0,375 ml

**Buffer del gel de stacking**

Tris	6,05 g
------	--------

Se lleva a pH 6,8 con HCl 1 N

Agua c.s.p.	100 ml
-------------	--------

**Gel de stacking 5%**

Acril-Bis (30:0,8)	1,16 ml
--------------------	---------

Buffer de stacking	0,87 ml
--------------------	---------

SDS 10%	70 $\mu$ l
---------	------------

Agua destilada	4,53 ml
----------------	---------

Se mezcla suavemente y se agregan los agentes polimerizantes

TEMED	4 $\mu$ l
-------	-----------

Persulfato de amonio 1,5%	0,35ml
---------------------------	--------

**2.4.3.1.3. Aplicación de las muestras**

Las calles se lavaron dos veces con agua destilada antes de la siembra y luego se aplicaron las muestras (5 a 10  $\mu$ l) con jeringa Hamilton.

**Buffer de reservorio (concentrado)**

Tris	3,0 g
------	-------

Glicina	14,4 g
---------	--------

SDS	1,0 g
-----	-------

Agua c.s.p.	100 ml
-------------	--------

La solución obtenida se filtró y almacenó a 4 °C. Antes de usar se diluyó 1/10.

#### 2.4.3.1.4. Condiciones de corrida

La electroforesis se desarrolló en un equipo Mini-Protean III Dual Slab Cell (Bio Rad). Los reservorios anódico y catódico se llenaron con buffer de reservorio de pH 8,3.

La corrida se realizó en dos etapas de intensidad de corriente constante; la primera etapa, a 20 mA por placa, finalizó cuando el frente de corrida abandonó el gel de stacking; la segunda etapa se corrió a 30 mA por placa evitando superar los 200 V. La electroforesis finalizó cuando el frente de corrida llegó al borde inferior del gel (aproximadamente 90 minutos).

Una vez completada la corrida, los geles se sumergieron durante 30 minutos en la solución fijadora. Luego fueron sumergidas en solución colorante (Coomasie Blue G250) durante aproximadamente 1 hora. Finalmente el gel se decoloró en solución decolorante 3 veces de 15 minutos. Con el fin de estimar las masas moleculares de las diferente bandas proteicas se sembraron en los geles marcadores de bajo peso molecular (P1: rango de 2,5 kDa a 16,94 kDa) y de alto peso molecular (P2: rango de 14,4 kDa a 94 kDa).

##### Solución Fijadora

Metanol	400 ml
Acido acético	100 ml
Agua c.s.p	500 ml

##### Solución Colorante

Acido acético	100 ml
Coomasie Blue G-250	0,25 g
Agua c.s.p	900 ml

**Solución Decolorante**

Acido acético	100 ml
Agua c.s.p	900

**2.5. Tratamiento analítico de datos por densitografía**

Para la digitalización de las bandas electroforéticas, los geles fueron escaneados a 360 píxeles por pulgada (ppi) en formato TIFF no comprimido. Posteriormente las imágenes se redujeron a un tamaño y resolución adecuados utilizando un programa de procesamiento de imágenes (Photoshop). Este programa fue utilizado también para ajustes de brillo, contraste e intensidad de color.

Una vez que las imágenes escaneadas fueron procesadas se obtuvieron los correspondientes densitogramas mediante el empleo del software Scion Image Beta 4.02 for Windows (Scion Corporation, <http://www.scioncorp.com>).

**2.6. Determinación del grado de hidrólisis. Método del TNBS**

El grado de hidrólisis (GH) representa la proporción de enlaces hidrolizados de la proteína utilizada como sustrato en relación con la misma proteína sin sufrir hidrólisis. Se calcula según la siguiente fórmula:

$$GH = (h/h_{tot}) \times 100$$

Donde h es el número de enlaces peptídicos hidrolizados y  $h_{tot}$  es el número total de enlaces peptídicos presentes en la proteína “sustrato”

Para la determinación del GH se analizó la concentración de grupos aminos libres con el método del ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS), (Adler-Nissen, 1979).

Los hidrolizados y el blanco (lactosuero) se diluyeron 1:10 en buffer fosfato 0,2125 M, conteniendo 1% SDS, pH 8,2. Las diluciones se incubaron a 75°C durante 15 minutos. Posteriormente se mezclaron 40 µl de muestra diluida, 480 µl del buffer y 160 µl de una solución del reactivo de TNBS diluido 1:200 en agua destilada y preparado en el momento. Los tubos se incubaron a 50°C durante 1 hora al

resguardo de la luz, y luego se detuvo la reacción con 640 µl de HCl 0,1N. Se dejó enfriar los tubos en oscuridad durante aproximadamente 60 minutos y finalmente se leyó la absorbancia a 340 nm. Se utilizó leucina como patrón para la construcción de la curva de calibración, con concentraciones 0,225; 0,450; 0,90; 1,125 y 2,25 mM a partir de una solución stock de 4,5 mM. Las diluciones se efectuaron con el mismo buffer fosfato con SDS al 1%. Tanto las determinaciones de los puntos de la curva patrón como las de las muestras analizadas se realizaron por triplicado.

El grado de hidrólisis fue calculado con la siguiente aproximación:

$$GH \% = 100 \cdot [(NH_2 - NH_{20}) / (NH_{2\infty} - NH_{20})]$$

Donde  $NH_2$  indica la concentración de grupos aminos libres de la muestra,  $NH_{2\infty}$  y  $NH_{20}$  se refieren a una muestra hidrolizada completamente y al aislado sin hidrolizar, respectivamente.

## 2.7. Determinación de Actividad Biológica

### 2.7.1. Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

La actividad inhibitoria de ECA *in vitro* fue medida utilizando el sustrato fluorogénico Abz-PheArgLys(DNP)Pro-OH (Carmona, Schwager, Juliano, Juliano, & Sturrock, 2006).

Muestras de hidrolizado fueron liofilizadas a sequedad durante 24 horas en liofilizador, luego se resuspendió el sólido en 100 µl de agua bidestilada, concentrando 10 veces la muestra. La actividad inhibitoria de los péptidos generados por hidrólisis fue determinada incubando 3 µl de ECA con 2 µl de una solución de sustrato en DMSO (0,5mg/ml) en presencia de 25 µl de muestra y llevando a un volumen final de 3 ml en una cubeta de cuarzo con buffer Tris-HCl 0,1 M, pH 7,0, conteniendo NaCl 50 mM y  $Cl_2Zn$  10 µM a 37 °C. La reacción se llevó a cabo utilizando un espectrofluorómetro RF-1501 (Shimadzu Corporation,



Kyoto, Japón) registrando el incremento de la fluorescencia ( $\lambda_{ex} = 320 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 420 \text{ nm}$ ) durante 3 minutos. Como control positivo de inhibición se utilizó un stock de Captopril (1 mM en agua), inhibidor sintético de ECA. Las determinaciones se realizaron por triplicado y los datos fueron expresados en porcentajes de inhibición (un resultado de 0% corresponde a la mezcla de reacción sin el inhibidor). Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.

## 2.8. Aislamiento y purificación de los péptidos bioactivos presentes en los hidrolizados.

Las muestras obtenidas y ultrafiltradas como se describe en el tercer método de la sección 2.4.2. fueron analizadas por cromatografía de fase reversa (RP). Se empleó un equipo ÄKTA purifier compuesto por dos bombas P-900, un detector UV-900 conectado a una computadora personal con software Unicorn 5.11. Para la separación de los péptidos se utilizó una columna C-18 conformada por un cartucho LiChroCART 250-4 con relleno LiChrosphere 100, 5 $\mu\text{m}$  (Merck) y sostén para cartucho manu-CART 4 (Merck).

La columna fue equilibrada con TFA 0,1% y los péptidos fueron eluidos a una velocidad de flujo de 0,7 ml/min utilizando un gradiente lineal de hidrofobicidad creciente hasta alcanzar un 50% de acetonitrilo en TFA 0,1%. Se sembraron 250  $\mu\text{l}$  de la muestra previamente ultrafiltrada empleando una jeringa. El eluato fue monitoreado constantemente a 215 y 280 nm.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 1. ANÁLISIS DEL EXTRACTO ENZIMÁTICO

El contenido de proteínas del extracto crudo obtenido a partir del látex de frutos de *Araujia hortorum* fue de 5,4 mg/ml. Utilizando caseína como sustrato se pudo detectar actividad proteolítica en el extractivo; tal como fue definido en M&M 2.3.1. se calculó la actividad caseinolítica para el mismo que fue de 34 U<sub>CAS</sub>. Las peptidasas responsables de la mencionada actividad son del tipo cisteínico (Obregón et al., 2001).

Según lo reportado Obregón et al. (2001) al examinar la actividad peptidásica de la preparación cruda en función del pH, el extracto de *A. hortorum* mostró la máxima actividad entre pH 7,5 y 8,5.

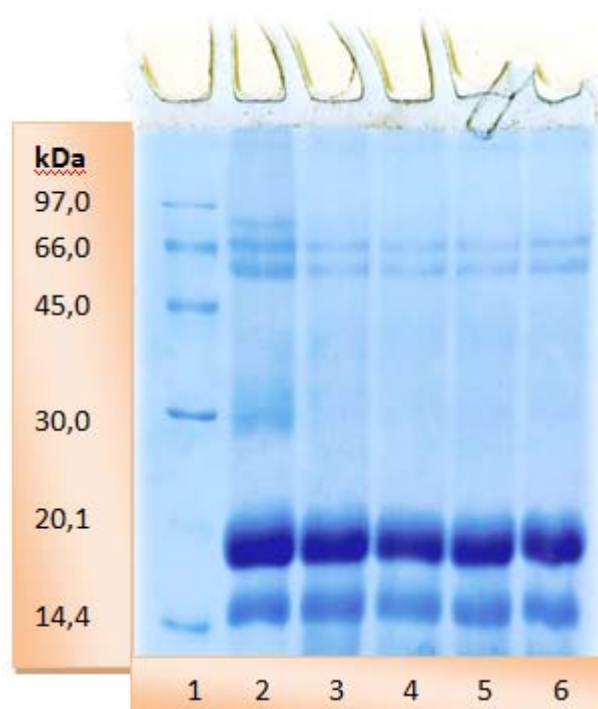
En presencia de caseína como sustrato, la actividad enzimática del extracto crudo aumentó con la temperatura en función del tiempo, llegando a un máximo de actividad a los 60 °C. Por encima de dicha temperatura, entre los 70 °C y 80 °C, el extracto pierde rápidamente su actividad caseinolítica, posiblemente debido a un proceso de desnaturalización proteica y no debido a autólisis. Este comportamiento con la temperatura en presencia y ausencia de sustrato indicaría un rol protector por parte del sustrato (Obregón et al., 2001).

## 2. OBTENCIÓN DE PÉPTIDOS POR HIDRÓLISIS CONTROLADA

### 2.1. Optimización de la reacción de hidrólisis

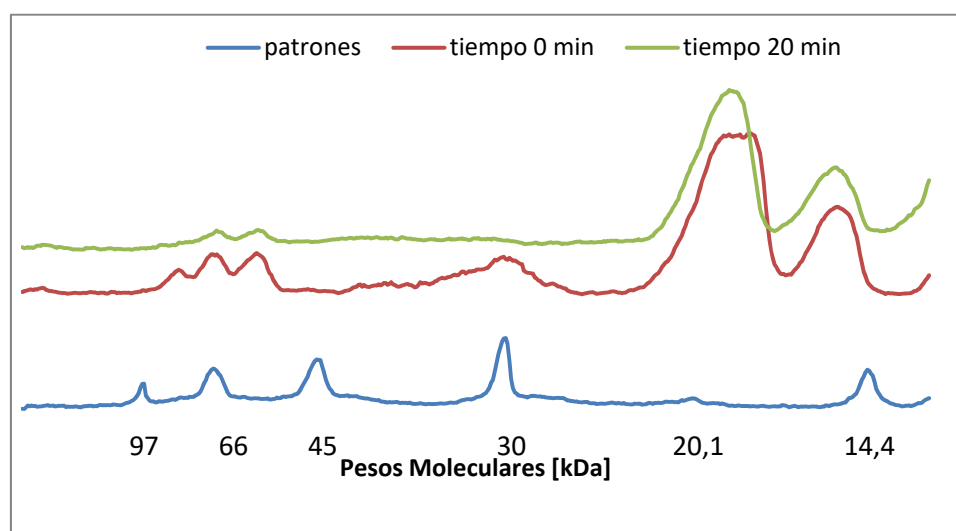
A fin de optimizar la reacción de hidrólisis, la primera variable en ajustarse fue el tiempo de reacción, para ello se siguió el método de (Vairo Cavalli et al. 2005) con pequeñas modificaciones como se indica en la sección M&M 2.4.1. En las Fig. 1 y 2 se puede observar el perfil de hidrólisis de las proteínas de lactosuero bovino obtenido con el extracto crudo de latex de *A. hortorum*. En éstos ensayos las reacciones se detuvieron mediante el agregado de ácido tricloroacético al 5%. En la calle 2 de la Fig. 1 se observan las bandas correspondientes a las proteínas presentes en el lactosuero bovino, en orden decreciente de masa molecular:

lactoferrina, seroalbúmina bovina, inmunoglobulinas,  $\beta$ -lactoglobulina (la banda más intensa) y  $\alpha$ -lactoalbúmina.

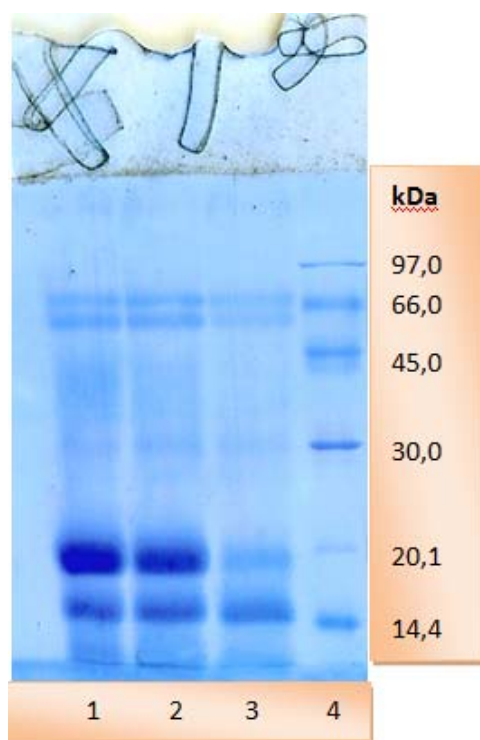


**Figura 1.** Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. *Calle1:* marcadores de masa molecular (GE):  $\alpha$  - lactoalbúmina (14,4 kDa), inhibidor de tripsina (20,1 kDa), anhidrasa carbónica (30,0 kDa), ovoalbúmina (45,0 kDa), albúmina (66,0 kDa), fosforilasa b (97,0 kDa); *calles 2, 3, 4, 5 y 6:* tiempos de hidrólisis 0, 10, 20, 30 y 40 minutos, respectivamente

En base a los resultados mostrados en las figuras 1 y en el densitograma (Fig 2.) se aprecia que la banda perteneciente a la lactoferrina de aproximadamente 80 kDa en las condiciones del ensayo fue hidrolizada en un 79 % luego de 10 minutos de incubación, se hizo menos apreciable luego de 20 minutos, llegando a hidrolizarse completamente a partir de los 30 minutos. En la Fig. 3 se observa que la banda de 66 kDa, correspondiente a seroalbúmina bovina, fue degradada en un 50% luego de los 180 minutos de hidrólisis, mientras que las inmunoglobulinas se hidrolizaron un 60% luego del mismo tiempo de reacción.

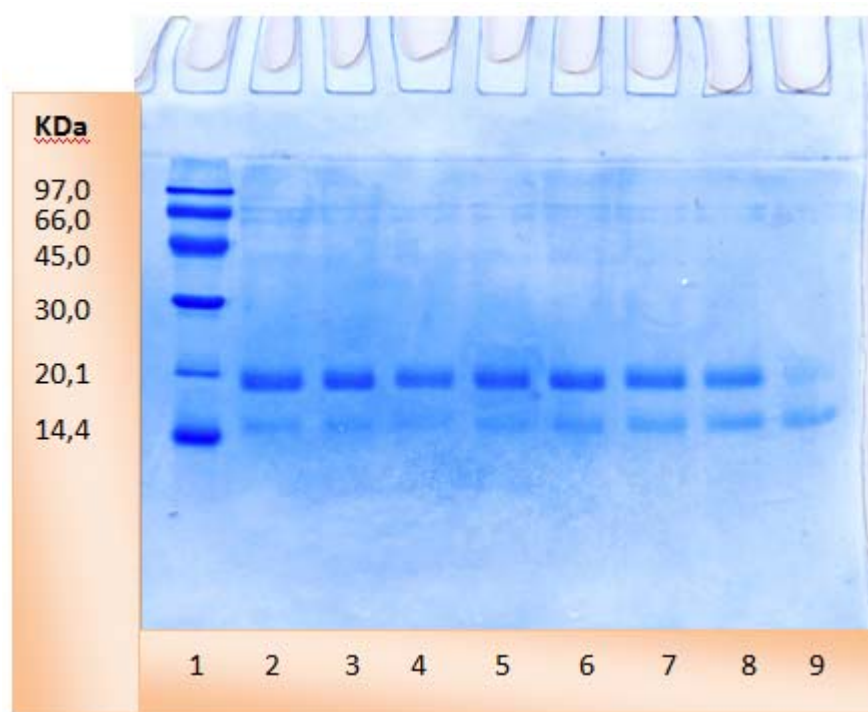


**Figura 2.** Densitograma correspondiente a la electroforesis mostrada en las Fig. 1. En azul: la densitografía de los patrones de masa molecular, en rojo: el perfil del lactosuero bovino y en verde el hidrolizado de 20 minutos.

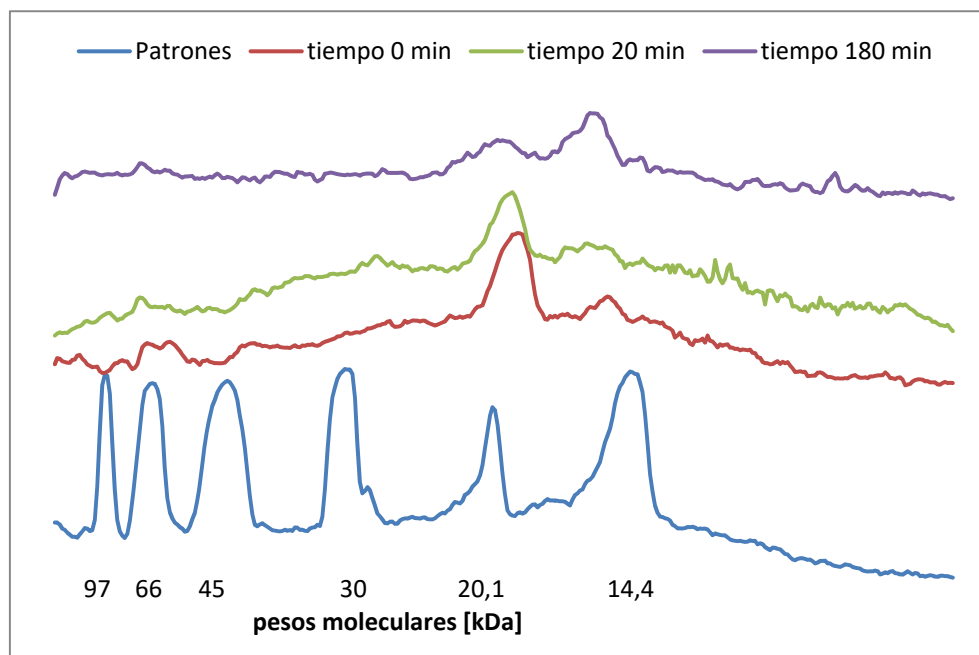


**Figura 3.** Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. Calles 1, 2 y 3: tiempos de hidrólisis de 60, 90 y 180 minutos, respectivamente, calle 4: marcadores de masa molecular (GE).

Como se observa en las Fig. 1 y 3, no puede estimarse el porcentaje de hidrólisis de  $\beta$ -lactoglobulina y  $\alpha$ -lactoalbúmina de masas 18,4 kDa y 14,2 kDa respectivamente, por lo que se realizó una nueva electroforesis disminuyendo la cantidad de muestra sembrada en cada calle (Fig. 4).



**Figura 4.** Perfil de hidrólisis de lactosuero bovino. SDS-PAGE al 14%. *Calle 1:* marcadores de masa molecular (GE), *calles 2 a 9:* tiempos de hidrólisis de 0, 10, 20, 30, 40, 60, 90 y 180 minutos respectivamente.



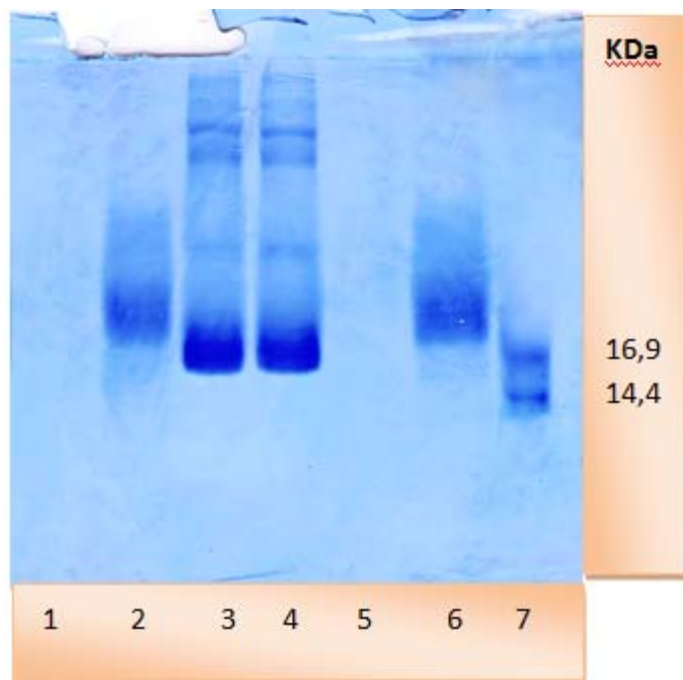
**Figura 5.** Densitograma correspondiente a la electroforesis mostrada en las Fig. 4. En azul: la densitografía de los patrones de masa molecular, en rojo: el perfil del lactosuero bovino, en verde el hidrolizado de 20 minutos y en violeta el hidrolizado de 180 minutos.

A partir de la Fig. 4 y de su densitograma (Fig. 5), se observa que la banda de 18,4 kDa correspondiente a la  $\beta$ -lactoglobulina fue disminuyendo en intensidad muy levemente con el transcurso del tiempo. La degradación fue del 13% a los 20 minutos de reacción, haciéndose notoria a los 180 minutos con un 75% de degradación. Por otro lado, la banda de 14,2 kDa que corresponde a la  $\alpha$ -lactoalbúmina, durante los primeros 20 minutos de hidrólisis se degradó un 30% según los resultados obtenidos por el programa Scion Image, pero luego de los 30 minutos de reacción la banda se intensificó debido probablemente a la aparición de un fragmento de alguna proteína de mayor masa molecular con esta masa.

Dado que no se observan diferencias significativas en el perfil de hidrólisis de 20, 30 y 40 minutos se seleccionó el tiempo 20 minutos y 180 minutos para realizar posteriores ensayos.

Se estudiaron tres procedimientos diferentes para detener la reacción de hidrólisis como fueron descritos en la sección M&M ítem 2.4.2.

En primer lugar se ensayó la detención de la hidrólisis del lactosuero luego de transcurrido el tiempo de reacción (20 min) por shock térmico (100 °C).



**Figura 6.** Hidrólisis de lactosuero bovino a 20 min, detenida por shock térmico. SDS-PAGE de 20%. Calles 1 y 5: hidrólisis durante 20 min, con posterior detención de la reacción por shock térmico; calles 2 y 6: hidrólisis durante 20 min con detención de la reacción por el agregado de buffer de muestra desnaturizante; calle 3: blanco de la enzima; calle 4: lactosuero con enzima inactivada previamente por temperatura; calle 7: marcadores de masa molecular (GE)

En la Fig. 6 se muestran los resultados de este ensayo. Si bien el extracto enzimático se inactiva con la temperatura, tal como observa en la calle 4, el calentamiento aumenta la velocidad de reacción en forma descontrolada. La detención de la hidrólisis mediante shock térmico (calles 1 y 5) fue inefectiva ya que la reacción continuó hasta completar la desnaturalización enzimática. La hidrólisis de 20 min fue total y no parcial y controlada como se pretendía. Es importante mencionar que ha sido reportado el uso de tratamientos térmicos para aumentar la susceptibilidad de proteínas de lactosuero como la  $\beta$  - lactoglobulina



a la proteólisis enzimática para la producción de péptidos bioactivos (Hernández-Ledesma, Ramos, Recio, & Amigo, 2006), lo que también explicaría en parte la hidrólisis descontrolada observada.

Se observó también diferencia en el perfil de hidrólisis cuando la reacción fue detenida por el agregado de buffer desnaturalizante, conteniendo  $\beta$  - mercaptoetanol, con respecto al perfil obtenido cuando la reacción se detuvo por el agregado de ácido (Fig. 1 calle 4). Esto se debe probablemente a la activación de las enzimas presentes en el extractivo por el  $\beta$  - mercaptoetanol, tal como ha sido reportado para otras enzimas cisteínicas de la misma familia (Priolo et al. 2000).

Descartando el primer método propuesto, se procedió a detener la hidrólisis mediante la modificación del pH de la mezcla de reacción, descendiendo el mismo hasta pH 4,5 adicionando ácido clorhídrico (HCl) 0,1N una vez alcanzado los 20 min de hidrólisis, tal como se mencionó en M&M 2.4.2. Para tal ensayo fueron requeridos 2,75 ml de ácido.

Paralelamente se realizó otra mezcla de reacción para medir la absorbancia a 280 nm con el tiempo transcurrido luego de detener la reacción, con el fin de corroborar si las enzimas de EC fueron inactivadas por el ácido, tal como se indicó en M&M. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

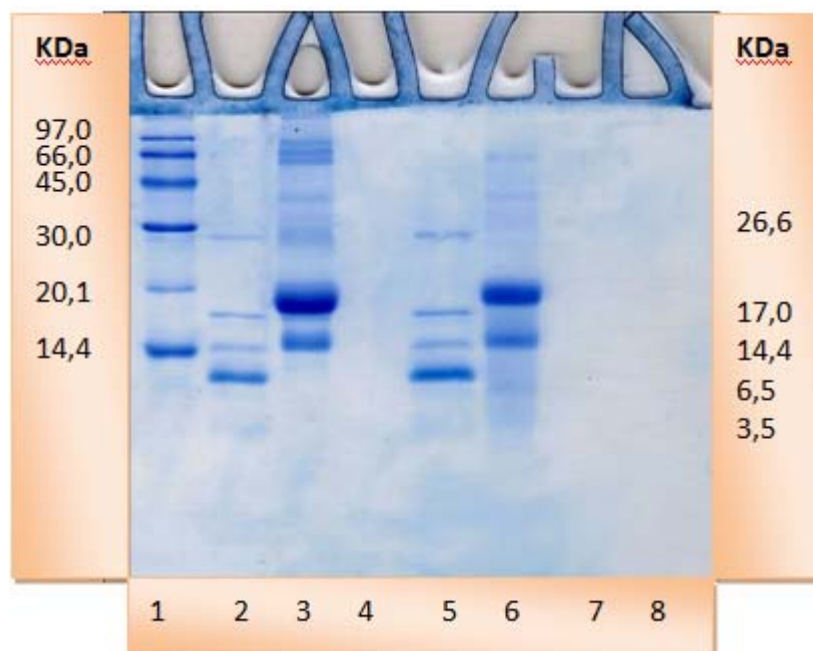
**Tabla 1.** Absorbancia a 280 nm de los hidrolizados detenidos con HCl

Tiempo (min)	Abs (280nm)
0	1,1449
30	1,1948
60	1,2493
90	1,3252

A partir de los datos de absorbancia a 280 nm se observa que la misma aumentó a medida que transcurrió el tiempo. De acuerdo a Priolo et al. (2000) las enzimas presentes en el EC del latex de *Araujia hortorum* son activas en un rango de pH

entre 7,5 y 8,5, por lo que a pH 4,5 no mostrarían actividad. En base a los resultados observados podríamos suponer que el agregado de este ácido incrementa la ruptura de las proteínas presentes en el sustrato, lo que produce el aumento de absorbancia. Dado que prosigue la hidrólisis en forma descontrolada éste método fue descartado.

El tercer método propuesto para detener la hidrólisis, mencionado en M&M ítem 2.4.2. consistió en ultrafiltrar la mezcla rápidamente luego de los 20 min de hidrólisis con membrana de corte de 3000 Da. Un aspecto común de los péptidos inhibidores de ECA no es la presencia de grupos funcionales, sino más bien el pequeño tamaño de los mismos y su C-terminal relativamente hidrofóbico. Esta característica hace de los métodos de fraccionamiento basados en el tamaño como la ultrafiltración, entre otros, una herramienta promisorio en la etapa de pre-concentración de estos péptidos bioactivos (López-Fandiño, Otte, y van Camp 2006). La Fig. 7 muestra el análisis por SDS-PAGE de este método que permitió en un único paso detener la reacción mediante separación física de la enzima y obtener un concentrado de péptidos menores de 3000 Da. Ya que por su baja masa no pueden visualizarse los péptidos por SDS-PAGE (carriles 4 y 8 de la Fig. 7) éstos se analizaron mediante RP-HPLC.

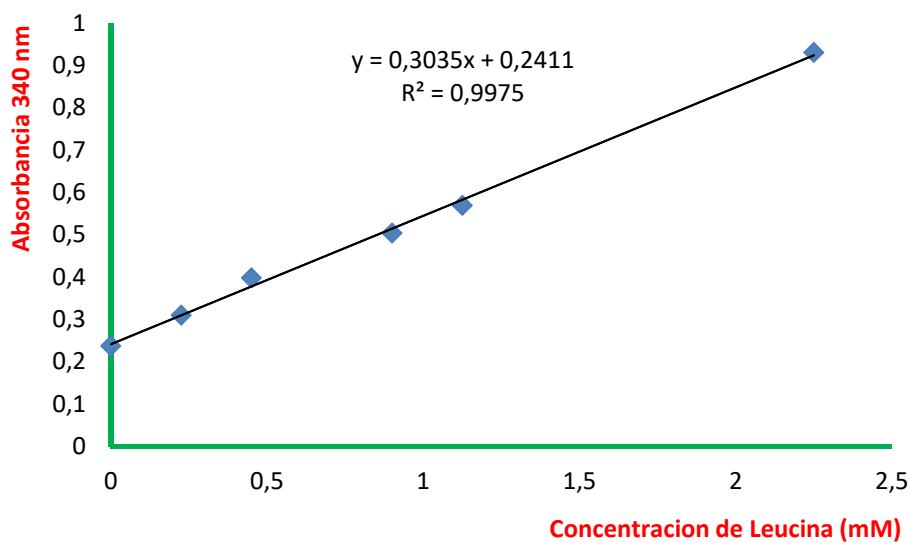


**Figura 7.** Hidrólisis de lactosuero bovino detenida por ultrafiltración luego de 20 minutos de reacción. SDS-PAGE 20%. *Calle 1:* Patrón Low Range (GE); *calle 2 y calle 5:* Patrones multi-peptídicos (BioRad): cadena oxidada  $\beta$  de insulina (3,5 kDa), aprotinina (6,5 kDa),  $\alpha$ -lactoalbúmina (14,4 kDa), mioglobina (17,0 kDa), triosafofato isomerasa (26,6 kDa), *calle 3:* lactosuero, *calle 4 y calle 8:* ultrafiltrado de lactosuero, *calle 6:* hidrolizado de lactosuero sin ultrafiltrar, *calle 7:* hidrolizado de lactosuero ultrafiltrado.

## 2.2. Determinación del grado de hidrólisis por el método del TNBS

Como se describe en la sección 2.6. de M&M se determinó el grado de hidrólisis del lactosuero luego de 20 minutos de reacción por acción del EC de *A. hortorum*.

La Fig. 8 muestra la curva patrón obtenida con el estándar de Leu.



**Figura 8.** Curva patrón de leucina del método del TNBS

Tal como se indicó en M&M, el grado de hidrólisis fue calculado mediante la siguiente aproximación:

$$GH \% = 100 \times [(NH_2 - NH_{20}) / (NH_{2\infty} - NH_{20})]$$

Donde  $NH_2$  indica la concentración de grupos aminos libres de la muestra,  $NH_{2\infty}$  y  $NH_{20}$  se refieren a una muestra hidrolizada completamente y al aislado sin hidrolizar, respectivamente.

A partir de la curva patrón se calculó el valor de la concentración grupos aminos libres  $NH_2$  y  $NH_{20}$  de la muestra correspondientes a los tiempos 20 y 0 min de hidrólisis, respectivamente. Los mismos fueron 1,22 y 0,62 en cada caso.

El término  $NH_{2\infty}$  se estimó utilizando la siguiente fórmula propuesta por (Bressani, 1994)

$$NH_{2\infty} = (1/PM \text{ del aa en la proteína}) \times (1 + f_{lys}) \times (\text{concentración de proteína})$$

El grado de hidrólisis fue de 1% de acuerdo a estos cálculos en las condiciones ensayadas, lo que a su vez se ajusta a lo observado por SDS-PAGE.

### 3. DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA: ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA

Existe una variedad de péptidos bioactivos que inhiben angiotensina I, ECA y el receptor tipo 1 de angiotensina II y que contribuyen a la prevención y el tratamiento de la hipertensión. Estos péptidos inhibitorios derivan de proteínas alimentarias o de productos artificiales sintéticos. Los hidrolizados de proteínas de leche entera, caseinatos, proteínas de suero y las fracciones enriquecidas en proteínas individuales de la leche son potencialmente una buena fuente de péptidos inhibitorios de ECA (Hong et al., 2008). La búsqueda de actividad inhibitoria de ECA en una aproximación clásica comienza con la determinación de esta actividad *in vitro* para la selección de hidrolizados y/o péptidos derivados de proteínas de leche u otras fuentes (López-Fandiño, Otte y van Camp, 2006; Philanto-Lepälä, 2001). En este trabajo se buscaron péptidos inhibitorios de ECA en proteínas de lactosuero como se describe en M&M 2.7 siguiendo el protocolo modificado de Carmona et al. (2006).

Para obtener un rango de valores de referencia respecto de un inhibidor conocido se realizó un ensayo de inhibición *in vitro* de ECA (Carmona et al., 2006) con distintas concentraciones del inhibidor comercial Captopril. En la Tabla 2 se muestran dos de las concentraciones ensayadas.

**Tabla 2.** Actividad inhibitoria sobre ECA de Captopril (control positivo de inhibición), lactosuero e hidrolizado de proteínas de lactosuero con EC de *A. hortorum* por 20 y 180 min

	% de Inhibición
Blanco de Enzima	0
Captopril 0,1 $\mu$ M	74 $\pm$ 4
Captopril 0,01 $\mu$ M	40 $\pm$ 6
Hidrolizado 20 minutos	52 $\pm$ 1
Hidrolizado 180 minutos	52 $\pm$ 7
Blanco de Lactosuero	21,9 $\pm$ 0,2

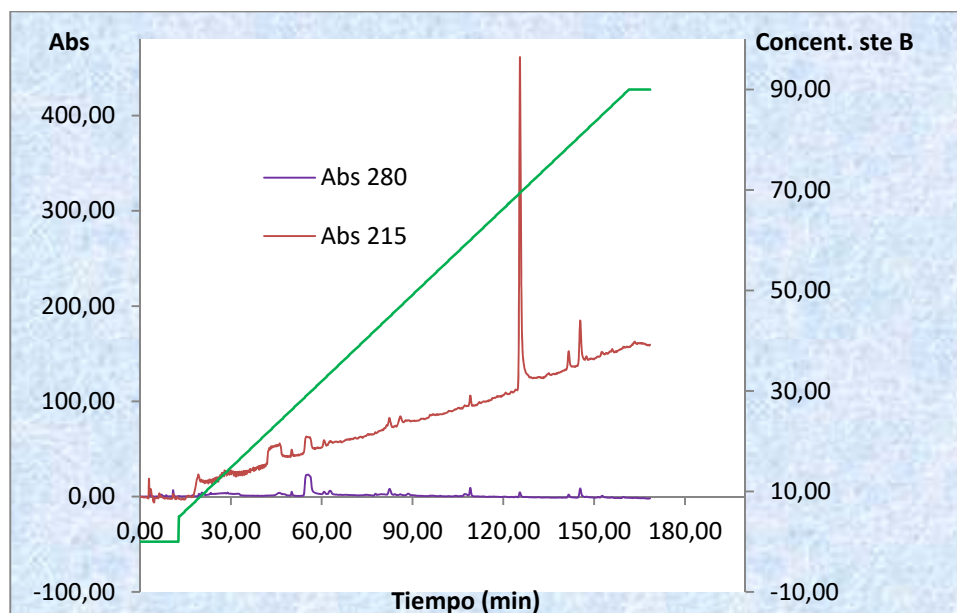
Según éstos resultados, las muestras hidrolizadas durante 20 y 180 minutos poseen aproximadamente el doble de actividad inhibitoria de ECA que el lactosuero sin hidrolizar. Además éstos valores coinciden con los valores de inhibición obtenidos para Captopril con una concentración entre 0,1 y 0,01  $\mu\text{M}$ , que está de acuerdo con los valores observados en bibliografía (Carmona et al. 2006).

#### 4. AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS PÉPTIDOS BIOACTIVOS PRESENTES EN LOS HIDROLIZADOS.

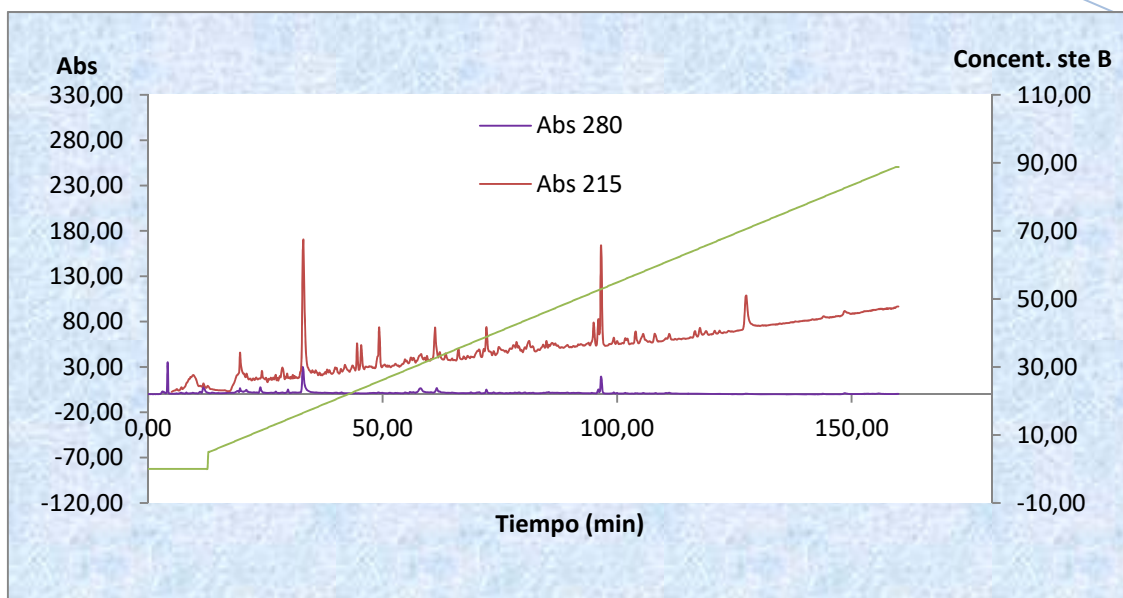
Se procedió a la purificación de los péptidos obtenidos mediante cromatografía de fase reversa (RP) empleando un equipo AKTA purifier, tal como se describió en la sección 2.8. de M&M. (Walsh et al., 2004).

Las muestras utilizadas fueron blanco de Lactosuero, hidrolizados de 20 min y muestras con 180 min de hidrólisis. (M&M 2.4.2., tercer método).

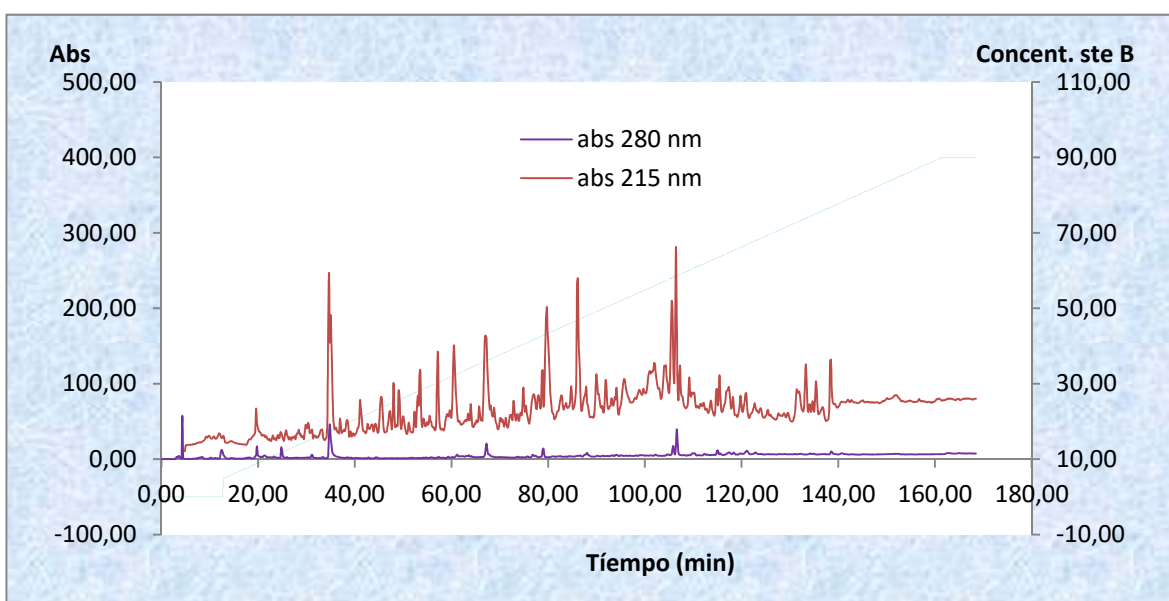
En las figuras siguientes se pueden apreciar los gráficos de salida de columna del HPLC para el blanco de Lactosuero y los hidrolizados de 20 y 180 minutos.



**Figura 9.** Salida de columna, blanco de Lactosuero. Columna equilibrada con TFA 0,1% (solvente A), gradiente lineal con ACN - Agua (50%- 50%) conteniendo TFA 0,1% (solvente B).



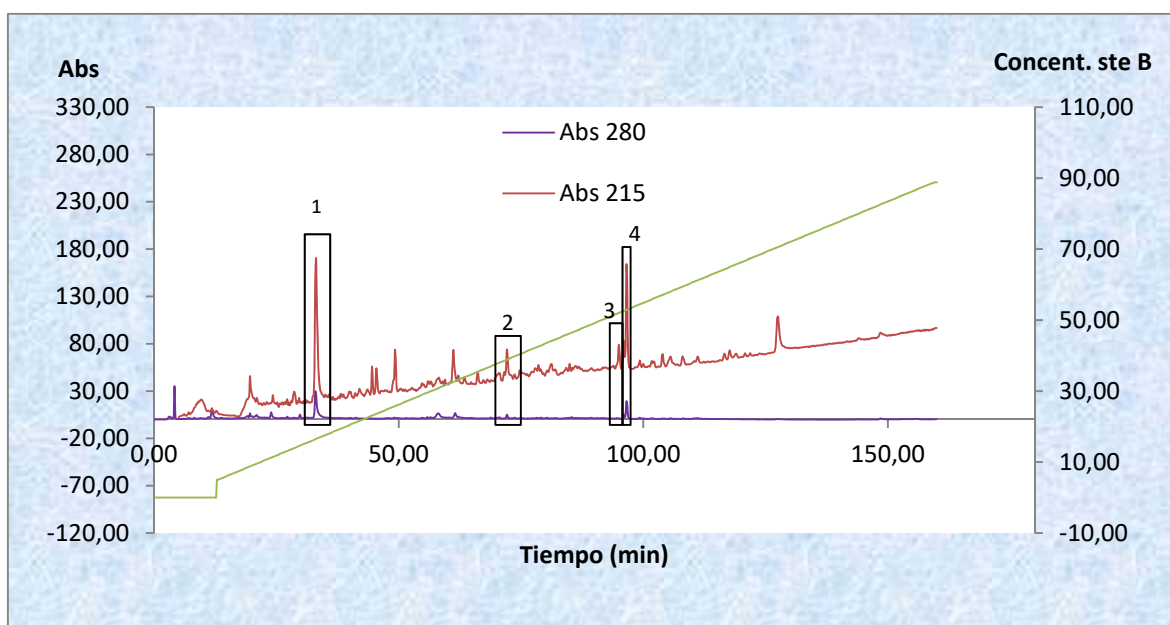
**Figura 10.** Salida de columna, hidrólisis de 20 min.



**Figura 11.** Salida de columna, hidrólisis de 180 min.

Comparando los cromatogramas del blanco de lactosuero (Fig. 9) con el del hidrolizado de 20 min (Fig. 10), se observó la presencia de 4 picos importantes en éste último que no aparecían en el blanco. Como era de esperarse el perfil cromatográfico del hidrolizado de 180 min (Fig. 11) resultó mucho más complejo.

Dado que no se observan diferencias significativas entre los porcentajes de inhibición de ECA de los hidrolizados de 20 y 180 min se decidió utilizar el hidrolizado de 20 minutos para los ensayos de aislamiento y purificación de los péptidos bioactivos por ser mucho menos complejo en cuanto a su composición peptídica.



**Figura 12.** Salida de columna, hidrólisis de 20 min donde se marcan los picos 1, 2, 3 y 4.

El primer pico del hidrolizado de 20 minutos salió a los 32 minutos aproximadamente, cuando el gradiente alcanzó un 8,2 % de ACN, el segundo pico a los 72 minutos con un 19,5 % de ACN, el tercero a los 96 minutos (26% de ACN) y el cuarto pico a los 96,5 minutos (26,4 % de ACN).

Se recolectaron el pico no retenido además de los picos 1, 2, 3 y 4 y se ensayó actividad inhibitoria de ECA a cada uno de ellos. Se pudo observar que la mayor actividad inhibitoria de ECA la retuvo el primer pico. El no retenido presentó también actividad inhibitoria, aún mayor que la que presentó el pico aislado.



**Tabla 3.** Actividad inhibitoria del no retenido y del pico 1 sobre ECA

	% de Inhibición
No retenido	83 ± 2
Pico 1	73 ± 1,5

La cantidad de proteínas presente en el hidrolizado y el pico aislado se determinó por el método de Lowry tal como se describió en M&M 2.2.2. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4.** Concentración de proteínas en cada muestra por el método de Lowry

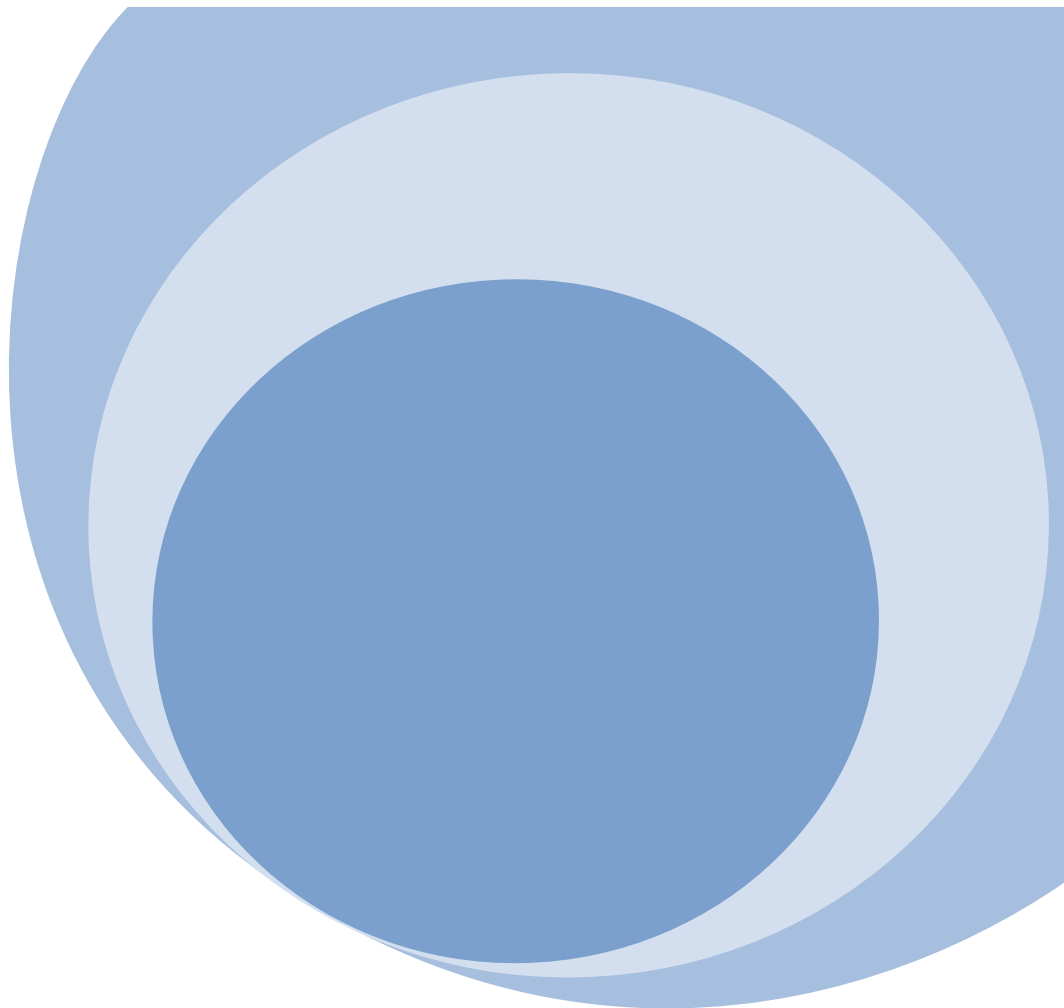
Muestra	Concentración de proteínas (µg/ml)
Hidrolizado 20 min	52,03
Pico 1	8,37

#### 4.1. Oportunidad para el diseño de futuros alimentos

Como ha sido discutido previamente muchas proteínas de la dieta poseen propiedades biológicas específicas que las convierten en potenciales ingredientes de alimentos funcionales o alimentos promotores de salud. En este trabajo se obtuvieron hidrolizados de proteínas de lactosuero que presentan péptidos con actividad inhibitoria de ECA. Estos péptidos inactivos dentro de la secuencia de la proteína parental fueron liberados mediante hidrólisis controlada por proteasas cisteínicas presentes en el látex de *A. hortorum*. Los péptidos de lactosuero con actividad inhibitoria de ECA reportados por otros autores como f(50-52), (99-108), (105-110) y (104-108) de  $\alpha$ -lactalbúmina, f(22-25), (32-40) y (81-83) han sido liberados principalmente con la enzima digestiva tripsina. Aunque, otras enzimas o combinaciones de enzimas también han sido utilizadas, como pepsina, quimotripsina y proteinasa K (Philanto-Lepälä 2001).

Luego de la hidrólisis los péptidos han sido fraccionados y enriquecidos satisfactoriamente mediante el uso de membranas de ultrafiltración. En una etapa futura el péptido aislado por HPLC debe ser caracterizado para conocer su secuencia y su acción fisiológica debe ser comprobada *in vivo*. Los hallazgos encontrados en estos estudios podrán ser explotados en la producción de alimentos con propiedades saludables especiales.

Existe un creciente interés comercial en la producción de péptidos bioactivos. En la actualidad hay productos comerciales que contienen péptidos con actividad biológica disponibles, en Japón un alimento útil en la prevención de la hipertensión y enfermedades del sistema circulatorio contiene el dodecapéptido f(23-34) de  $\alpha_{s1}$ -caseína (Philanto-Lepälä 2001).



# REFERENCIAS

- Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*, 27(6), 1256-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/544653>
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche*. Madrid: Reverté.
- Anderson, J. W. (1968). Extraction of enzymes and subcellular organelles from plant tissues. *Phytochemistry, Volume 7*, 1973-1988.
- Bressani, R. (1994). Composition and nutritional properties of amaranth. In O. Paredes-López (Ed.), *Amaranth, Biology, Chemistry and Tecnology* (pp. 185-206). Florida: CRC Press.
- Carmona, A. K., Schwager, S. L., Juliano, M. a, Juliano, L., & Sturrock, E. D. (2006). A continuous fluorescence resonance energy transfer angiotensin I-converting enzyme assay. *Nature protocols*, 1(4), 1971-6. doi:10.1038/nprot.2006.306
- Chen, Z.-Y., Peng, C., Jiao, R., Wong, Y. M., Yang, N., & Huang, Y. (2009). Anti-hypertensive nutraceuticals and functional foods. *Journal of agricultural and food chemistry*, 57(11), 4485-99. doi:10.1021/jf900803r
- Contra, H. S., Estrada, L. R., Chávez, A. G., & Hernández, H. (2008). Artemisa El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial, 1.
- Di Bernardini, R., Harnedy, P., Bolton, D., Kerry, J., O'Neill, E., Mullen, A. M., & Hayes, M. (2011). Antioxidant and antimicrobial peptidic hydrolysates from muscle protein sources and by-products. *Food Chemistry*, 124(4), 1296-1307. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.foodchem.2010.07.004

- Dimitri, M. J. (1978). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería* (pp. 774-780). Buenos Aires: Acme SACI.
- Editorial. (2011). La pandemia que avanza. *Diario El día. Nota de tapa*, pp. 1-5. La Plata.
- Gagnaire, V., Molle, D., Herrouin, M., & Leonil, J. (2001). Peptides identified during Emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4402-4413.
- Ginger, M. R., & Grigor, M. R. (1999). Comparative aspects of milk caseins. *Genetics*, 124, 133-145.
- Hernández-Ledesma, B., Ramos, M., Recio, I., & Amigo, L. (2006). Effect of beta-lactoglobulin hydrolysis with thermolysin under denaturing temperatures on the release of bioactive peptides. *Journal of chromatography. A*, 1116(1-2), 31-7. doi:10.1016/j.chroma.2006.03.006
- Hong, F., Ming, L., Yi, S., Zhanxia, L., Yongquan, W., & Chi, L. (2008). The antihypertensive effect of peptides: a novel alternative to drugs? *Peptides*, 29(6), 1062-71. doi:10.1016/j.peptides.2008.02.005
- Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1(2), 177-187. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.jff.2009.01.007
- Korhonen, H., & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960. doi:10.1016/j.idairyj.2005.10.012
- López-Fandiño, R., Otte, J., & van Camp, J. (2006). Physiological, chemical and technological aspects of milk-protein-derived peptides with antihypertensive

- and ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 16(11), 1277-1293.  
doi:10.1016/j.idairyj.2006.06.004
- Meisel, Hans. (1997). Biochemical properties of bioactive peptides derived from milk proteins: Potential nutraceuticals for food and pharmaceutical applications '. *Livestock Production Science*, 50, 125-138.
- Möller, N. P., Scholz-Ahrens, K. E., Roos, N., & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European journal of nutrition*, 47(4), 171-82. doi:10.1007/s00394-008-0710-2
- Obregón, W. D., Arribére, M. C., del Valle, S. M., Liggieri, C., Caffini, N., & Priolo, N. (2001). Two new cysteine endopeptidases obtained from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *Journal of protein chemistry*, 20(4), 317-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11594466>
- Oliva, Y., & Vega, S. (2004). Péptidos bioactivos derivados de las proteínas lácteas: Propiedades y aplicaciones principales. *Rev. Salud Anim.*, 26(3), 151-162.
- Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace- inhibitory peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 11.
- Priolo, N, Morcelle del Valle, S. R., Arribére, M. C., López, L. M. I., & Caffini, N. (2000). Isolation and characterization of a cysteine protease from the latex of *Araujia hortorum* fruits. *J. Protein Chem.*, 19, 39-48.
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-56. Elsevier Inc.  
doi:10.1016/j.peptides.2010.06.020

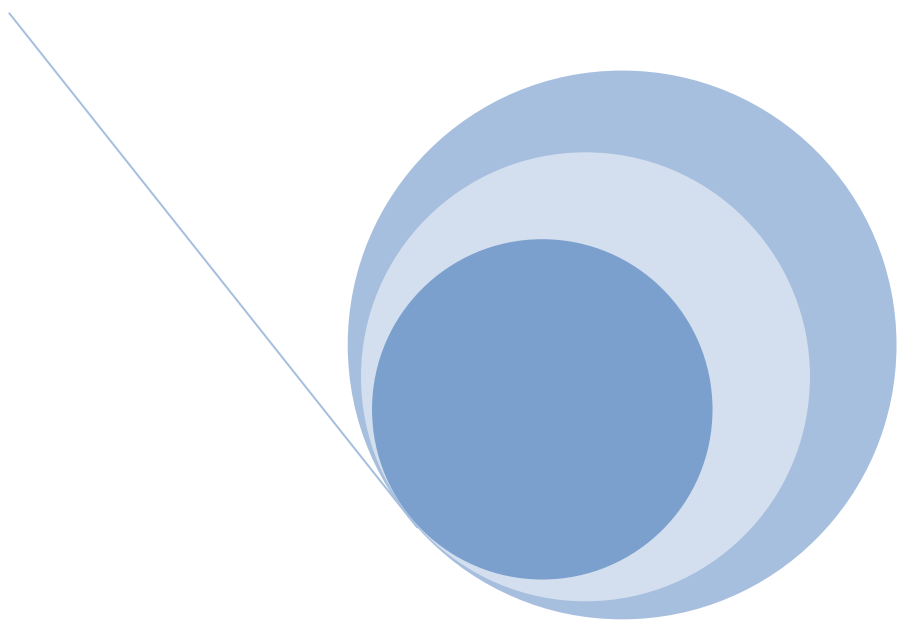
- Taverna, M. A. (2002). Composición química de la leche. *Proyecto Nacional de Lechería del INTA*. Retrieved from [http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/produccion\\_animal/calidad/pnl\\_cql.pdf](http://www.inta.gov.ar/rafaela/info/documentos/produccion_animal/calidad/pnl_cql.pdf)
- Torruco-Uco, J., Domínguez-Magaña, M., Dávila-Ortíz, G., Martínez-Ayala, A., Chel-Guerrero, L., & Betancur-Ancona, D. A. (2008). Péptidos antihipertensivos, una alternativa de tratamiento de origen natural: una revisión. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 6, 158-168.
- Vairo Cavalli, S., Claver, S., Priolo, N., & Natalucci, C. (2005). Extraction and partial characterization of a coagulant preparation from *Silybum marianum* flowers. Its action on bovine caseinate. *Journal of Dairy Science*, 2, 1-5. doi:10.1017/S0022029905000749
- Vecchi, B., & Añón, M. C. (2009). ACE inhibitory tetrapeptides from *Amaranthus hypochondriacus* 11S globulin. *Phytochemistry*, 70(7), 864-70. Elsevier Ltd. doi:10.1016/j.phytochem.2009.04.006
- Villadóniga, C., Errasti, M. E., Vairo Cavalli, S. E., Bruno, M. A., Barros, M., Morcelle del Valle, S. R., & Cantera, A. M. B. (2009). Productos bioactivos obtenidos por proteólisis (nutracéuticos y alimentos funcionales). In N. Caffini (Ed.), *Enzimas proteolíticas de vegetales superiores Aplicaciones industriales* (1st ed., pp. 273-297). Buenos Aires: CYTED.
- Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., & Millán, F. (2000). Péptidos bioactivos en proteínas de reserva. *Grasas y Aceites*, 51, 361-365.
- Walsh, D. J., Bernard, H., Murray, B. a, MacDonald, J., Pentzien, a-K., Wright, G. a, Wal, J.-M., et al. (2004). In vitro generation and stability of the lactokinin beta-

lactoglobulin fragment (142-148). *Journal of dairy science*, 87(11), 3845-57.  
doi:10.3168/jds.S0022-0302(04)73524-9





# Capítulo 2



# INTRODUCCIÓN



## 1. INHIBIDORES DE PROTEASAS

### 1.1. Definición

Los inhibidores de peptidasas (IPs) son compuestos químicos o bioquímicos que se unen a una proteasa impidiendo su acción biológica. Existen péptidos bioactivos cuya actividad biológica es inhibir proteasas.

### 1.2. Mecanismo de acción

El proceso de inhibición puede darse mediante dos mecanismos alternativos, mecanismo reversible o mecanismo irreversible. Los inhibidores con mecanismos irreversibles cambian la conformación de la enzima al unirse a la misma, cortan un enlace peptídico interno y se unen de manera covalente; ni el inhibidor ni la enzima pueden participar en futuras reacciones. En reacciones reversibles, el inhibidor se une directamente al sitio activo de la proteasa; esta reacción es reversible y el inhibidor puede disociarse de la enzima tanto en estado virgen o luego de una modificación por la proteasa (Rawlings et al. 2004). La actividad de los IPs obedece a su capacidad de formar complejos estables con las proteasas blanco, bloqueando, alterando o impidiendo el acceso del sustrato al sitio activo de la enzima mediante interacciones por puentes disulfuros, de hidrógeno o interacciones hidrofóbicas (Bode et al. 1992; Iwanaga et al. 2005).

### 1.3. Fuentes de inhibidores de proteasas

Los inhibidores de proteasas son habitualmente encontrados en todos los tejidos de las plantas, participando en los procesos metabólicos que requiere cada célula para su funcionamiento normal. Sin embargo, elevados niveles de inhibidores de proteasas son a menudo encontrados en varias plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* (Kim et al. 2009) y otro gran porcentaje en las familias *Leguminosae* y *Graminaceae* (Oliva. et al.2011). Este tipo de plantas generalmente los acumulan en tejidos de reserva.

Cabe citar como ejemplo las proteínas solubles de papa (*Solanum tuberosum*), las cuales están compuestas principalmente por proteínas inhibidoras de proteasas (50% aprox.) y patatina (40% aprox.).

#### 1.4. Clases de inhibidores de proteasas en plantas

Los inhibidores de proteasas pueden inhibir proteasas aspárticas, serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas, entre otras (Kim et al. 2009). Los inhibidores contra proteasas serínicas, cisteínicas y metalocarboxipeptidasas son ubicuos, encontrándose en la mayor parte de los tejidos, mientras que los inhibidores de proteasas aspárticas han sido encontrados en menos cantidad, aún cuando el número de especies estudiadas supera largamente el centenar (<http://www.ba.itb.cnr.it/PLANT-PIs/TabII.html>). De acuerdo con la secuencia de aminoácidos y de proteasas diana se reconocen 67 familias de inhibidores (Rawlings 2010). La diversidad y abundancia de IPs encontrada en vegetales los convierte en una excelente fuente para descubrir y obtener un gran número de moléculas líder que pueden ser analizadas para su posterior aplicabilidad en el área del desarrollo de nuevos fármacos.

#### 1.5. Importancia del estudio de inhibidores de proteasas para su aplicación en biomedicina

Los IPs representan una eficiente vía que tienen los organismos para el control de la actividad de proteasas endógenas y a su vez son herramientas que protegen a los tejidos frente a una proteólisis descontrolada en estados patológicos. Adicionalmente, los IPs pueden controlar la actividad de proteasas exógenas como las de virus, bacterias y parásitos, y de este modo estar involucrados en los mecanismos de defensa del organismo. Este control de la proteólisis por parte de los inhibidores representa uno de los mayores incentivos para la búsqueda de nuevos IPs. La modulación de la actividad proteolítica controlada por IPs nos proporciona una herramienta terapéutica valiosa, habiéndose probado su utilidad

no sólo en modelos experimentales sino también como agentes terapéuticos en humanos. Se han estudiado distintos IPs por su potencial actividad en el tratamiento de infecciones parasitarias (Becker. 1995), fúngicas (Abad-Zapatero. 1998), virales (Clercq 2004; Arribas, 2005), afecciones inflamatorias (Bilfinger. 2002), inmunológicas y respiratorias (Hugli. 1996), cardiovasculares (Ottaviani. 2005), tumorales (Jedinak. 2005) y en desórdenes neurovegetativos (Vassar. 1999). Otras patologías de particular relevancia en las que los IPs han sido estudiados como potenciales fármacos son malaria (Dahlgren et al. 2003), SIDA (Patick et al. 1998), hepatitis (Lin et al. 2004), coagulopatías (Gladwell. 2002) y la enfermedad de Alzheimer (Vassar et al. 1999).

Por otra parte se ha observado que los IPs de muchas plantas inhiben potencialmente el crecimiento de una variedad de cepas bacterianas y fúngicas patógenas, convirtiéndolos en excelentes candidatos para el uso como compuestos principales para el desarrollo de numerosos agentes antimicrobianos (Kim et al. 2009).

## 2. INHIBIDORES DE CARBOXIPEPTIDASAS

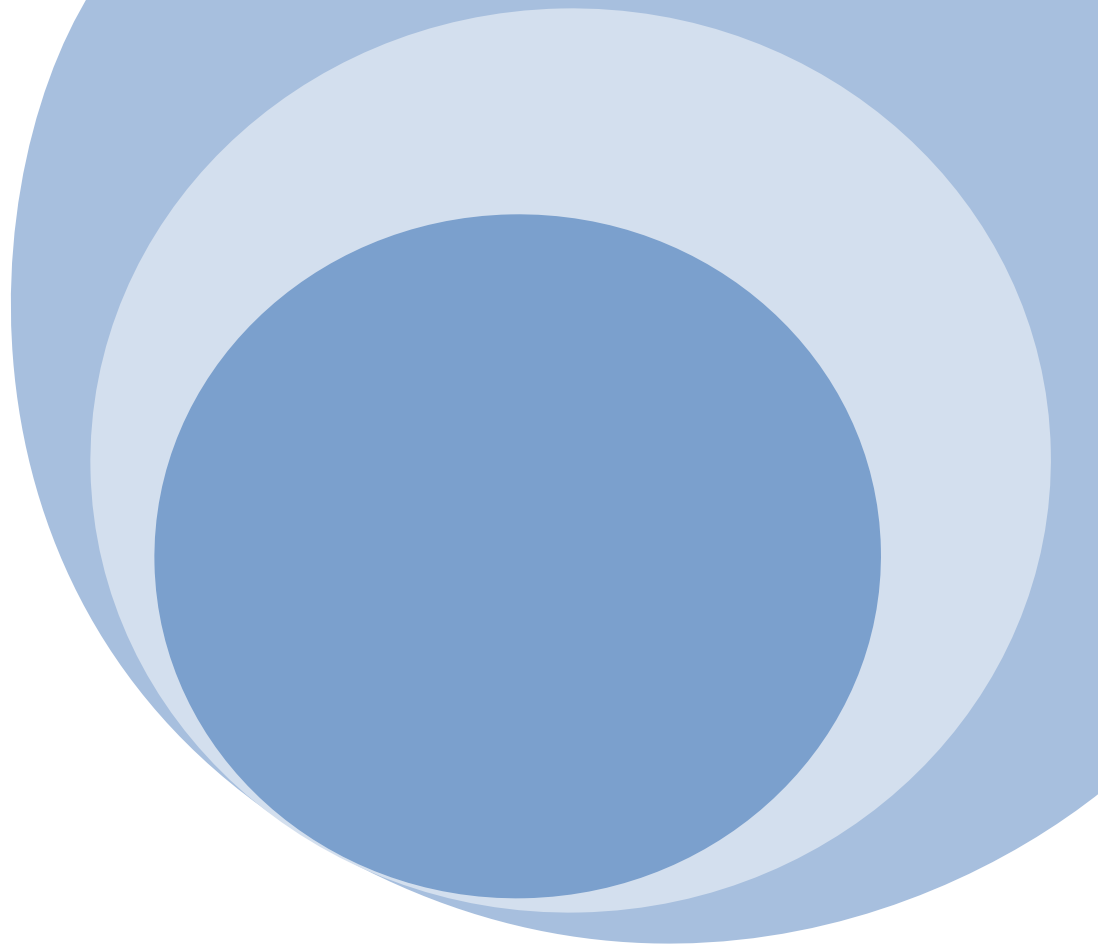
Algunos IPs de metalocarboxiproteasas (Hass. 1979; Hass. 1981) han cobrado importancia ya que regulan las metaloproteasas de matriz (MMPs), lo que es fundamental en el tratamiento de enfermedades tales como la artritis, el cáncer y la aterosclerosis (Nagase. 1996). Se han encontrado este tipo de inhibidores en plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae*, los tanto en tomate como en papa (Ryan. 1974; Hass. 1975; Hass and Hermodson. 1981). El inhibidor de Carboxipeptidasa A (PCI), obtenido a partir de *Solanum tuberosum* subespecie tuberosum, ha sido estudiado y caracterizado. El mecanismo de inhibición del PCI se basa en la interacción de su secuencia aminoacídica carboxilo terminal con la ranura del sitio activo de la enzima imitando la unión del sustrato a este sitio (Vendrell, 2000).

Un hallazgo interesante es que el PCI, de 4200 Da (Hass and Ryan. 1981; Hass et al. 1976), se comporta como un antagonista del Factor de crecimiento epidermal

(EGF), y se trata del primer antagonista del EGF humano que ha sido registrado, lo que lo convierte en un agente antitumoral putativo. Se sabe que el EGF y su receptor (EGFR) están involucrados en muchos aspectos del desarrollo de carcinomas, como el crecimiento de células tumorales, la vascularización, la invasión y metástasis. Se ha demostrado que el PCI compite con EGF para unirse al EGFR e inhibe la activación del EGFR y la proliferación celular inducida por este factor de crecimiento. El PCI, además suprime el crecimiento de varias líneas celulares de adenocarcinoma pancreático humano, tanto *in vitro* como en ratones. Aunque varios inhibidores de proteasas han sido señalados como posibles agentes antitumorales (Trow et al. 1993), este es el primer caso en que el efecto no es el resultado de su actividad inhibidora de proteasa, sino que su comportamiento es como un antagonista del EGF.

*Los objetivos específicos del presente capítulo fueron:*

- a) Obtener extractos crudos a partir de tubérculos de Solanum tuberosum subespecie andigenum variedad "Malcacha", que sean aptos para verificar presencia de actividad inhibitoria de proteasas.*
- b) Evaluar la actividad inhibitoria del extracto vegetal obtenido frente a carboxipeptidasa A.*
- c) Caracterizar el extracto crudo mediante ensayos de estabilidad térmica*
- d) Caracterizar los extractos tratados térmicamente mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF )*
- e) Evaluar la actividad inhibitoria de la Enzima Conversora de Angiotensina del inhibidor de carboxipeptidasa A presente en los extractos de papa.*

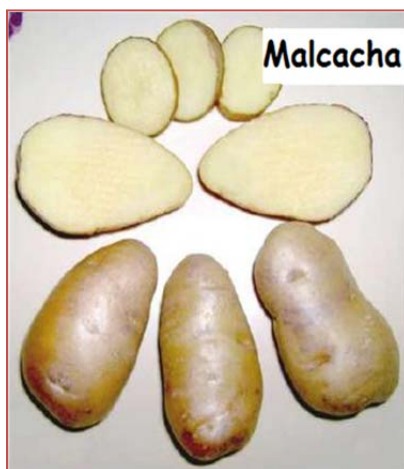


# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. MATERIAL VEGETAL

Como material de partida se utilizaron tubérculos de *Solanum tuberosum* subespecie andigenum variedad malcacha, provenientes de la Quebrada de Humahuaca, provincia de Jujuy, Argentina. El nombre vulgar de esta especie es “papa andina”, y es muy común su cultivo no solamente en el norte argentino, sino también en gran parte de Bolivia y Perú.



**Figura 1.** Papa andina, variedad “malcacha”

En estas zonas geográficas, *S. tuberosum* es una planta herbácea, tuberosa, perenne a través de sus tubérculos, caducifolia, de tallo erecto o semi-decumbente, que puede medir hasta 1 m de altura. El tubérculo de ésta papa es un tallo subterráneo y se halla engrosado para funcionar como un órgano de almacenamiento de nutrientes. Los tubérculos pueden presentar una forma alargada, redondeada u oblonga; su color, en tanto, puede ser blanco, amarillo, violeta o rojizo. En éstos tubérculos se encuentran almacenados inhibidores de proteasas. (Milan et al. 1987).

**Tabla 1:** Clasificación taxonómica de la familia Apocynaceae

Clasificación taxonómica	
Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Asteridae
Orden:	Solanales
Familia:	Solanaceae
Género:	Solanum
Especie:	<i>S. tuberosum</i>
Nombre binomial	
<i>Solanum tuberosum</i> L.	
Subespecie	
<i>S. tuberosum</i> ssp. andigena	

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1. Obtención de extracto crudo de tubérculos de “malcacha”

Las papas fueron peladas y lavadas con agua destilada fría. Luego se cortaron y trituraron en 150ml de agua destilada conteniendo 0,1mM DTT como agente antioxidante a 4°C, utilizando una licuadora a baja velocidad. A continuación se centrifugó diferencialmente a 8000 g durante 30 minutos a 4°C utilizando una centrífuga Hermle Z323K y luego a 15.000 g durante 60 min a la misma temperatura. El sobrenadante obtenido se denominó extracto crudo (EC), a partir del cual se realizarán las reacciones de identificación y caracterización.

## 2.2. Determinación de la presencia de actividad inhibitoria de Carboxipeptidasa A en el EC de “malcacha”

### 2.2.1. Actividad enzimática de Carboxipeptidasa A (CPA)

Para el ensayo de medición de actividad carboxipeptidásica se añadieron 15  $\mu$ l de solución de Carboxipeptidasa A (CPA) de páncreas bovino (Sigma-Aldrich),  $7,0 \times 10^{-9}$ M, en una cubeta de 1 cm de paso óptico conteniendo 1,5 ml buffer de reacción (Tris-HCl 20mM NaCl 0,5 M pH 8,0) y 15  $\mu$ l de solución 10 mM de sustrato [N-(4-metoxifenilazoformil)-Phe-OH, de color naranja] (AAFP). La reacción se llevó a cabo a 37°C. La actividad fue registrada durante 3 min por el descenso de la absorbancia a 350 nm (la hidrólisis del sustrato produce la desaparición del color naranja) durante 120 s.

### 2.2.2. Actividad inhibitoria de CPA

Para verificar que el EC de papa posee actividad inhibitoria de CPA se modificó el protocolo anterior de la siguiente manera: se incubó a 37°C, 1,4 ml de buffer de reacción con 100  $\mu$ l de EC de malcacha durante 3 minutos. Seguidamente se agregaron 15  $\mu$ l de sustrato AAFP y por último 15  $\mu$ l de la dilución de CPA.

## 2.3. Evaluación dosis-respuesta del EC de malcacha

Se evaluaron distintas concentraciones de EC de malcacha frente a CPA para determinar la concentración inhibitoria adecuada a utilizar en posteriores ensayos de caracterización enzimática.

Para ello se incubaron diluciones seriadas del EC con la enzima, durante 5 minutos a 37 °C, y se evaluó la actividad inhibitoria como se describió anteriormente.

## 2.4. Perfil electroforético del EC de malcacha

Se realizó una electroforesis al 20 % de Poliacilamida del EC para evaluar el perfil de tamaños moleculares que componen a la muestra. Esta técnica fue descrita en el Capítulo 1 (M&M sección 2.4.3.1).

## 2.5. Tratamiento térmico del extracto crudo

La mayoría de los inhibidores de proteasas que han sido identificados presentan una estructura compacta estabilizada por numerosos puentes disulfuro, esta característica estructural provee a la molécula de cierta estabilidad frente a determinadas condiciones extremas (Bartová et al. 2008). Las muestras fueron tratadas térmicamente por calentamiento a 60 °C, 70 °C, 85 °C y 100 °C durante 60 minutos como un paso preliminar de purificación. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se centrifugaron a 8000 x g por 30 min a 4 °C. El sobrenadante obtenido fue posteriormente centrifugado a 15.000 x g durante una hora para clarificar aún más la solución. Finalmente fue analizado para verificar la presencia de inhibidores estables térmicamente. Para ello se evaluó nuevamente la actividad inhibitoria de CPA.

## 2.6. Caracterización por espectrometría de masas (MALDI-TOF)

La espectrometría de masas MALDI-TOF descrita inicialmente por Hillenkamp (Hillenkamp et al. 1990) es una técnica precisa y muy sensible para la determinación de masas moleculares de hasta 200000 Da. La técnica consiste en mezclar la muestra a ser determinada con una matriz, la cual es introducida al espectrómetro e irradiada con un láser pulsátil al máximo de absorción de la matriz. La interacción de los fotones con la matriz y la muestra resulta en la formación de iones intactos relacionados con la masa molecular de la proteína. Este mecanismo acoplado con un espectrómetro de masas TOF (time of flight) permite calcular las masas de la muestra basado en el tiempo que tarda el ión formado en recorrer la distancia entre el lugar de formación del ión y el detector. El cuadrado de este tiempo es proporcional a la masa del ión e inversamente proporcional a la carga del mismo.

$$m/z \propto (\text{tiempo de vuelo})^2$$

$$m = \text{masa molecular}$$

$$z = \text{carga de la molécula}$$

El error típico en esta técnica es de alrededor de 1 Da en masas de 10000 Da o de 50 Da para masas de 50000 Da (Beavis et al. 1991). Este tipo de espectrometría es una medida de la masa química de la molécula, por ende no es afectada por las propiedades físicas e hidrodinámicas de la proteína como pasa con técnicas como el SDS-PAGE. Otra ventaja del MALDI es que es prácticamente insensible a cualquier buffer en el que esté la muestra, haciendo que sean necesarios menos pasos de purificación previa de la proteína para poder utilizarlo.

Los tratamientos térmicos y el extracto crudo fueron analizados en el Servicio de Proteómica del Instituto de Biomedicina y Biotecnología (IBB) de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) como parte de un intercambio realizado en el Proyecto de Cooperación Bilateral: Genómica y Proteómica de Biomoléculas de Origen Vegetal otorgado por el MinCyT de Argentina y el MICINN de España.

## 2.7. Actividad inhibitoria de la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)

Se determinó la actividad inhibitoria de la ECA *in vitro* a los extracto crudo y a las muestras crudas tratadas a 60, 70, 85 y 100°C. La técnica fue descripta en M&M 2.7 del Capítulo 1.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN



## 1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS CRUDOS CLARIFICADOS

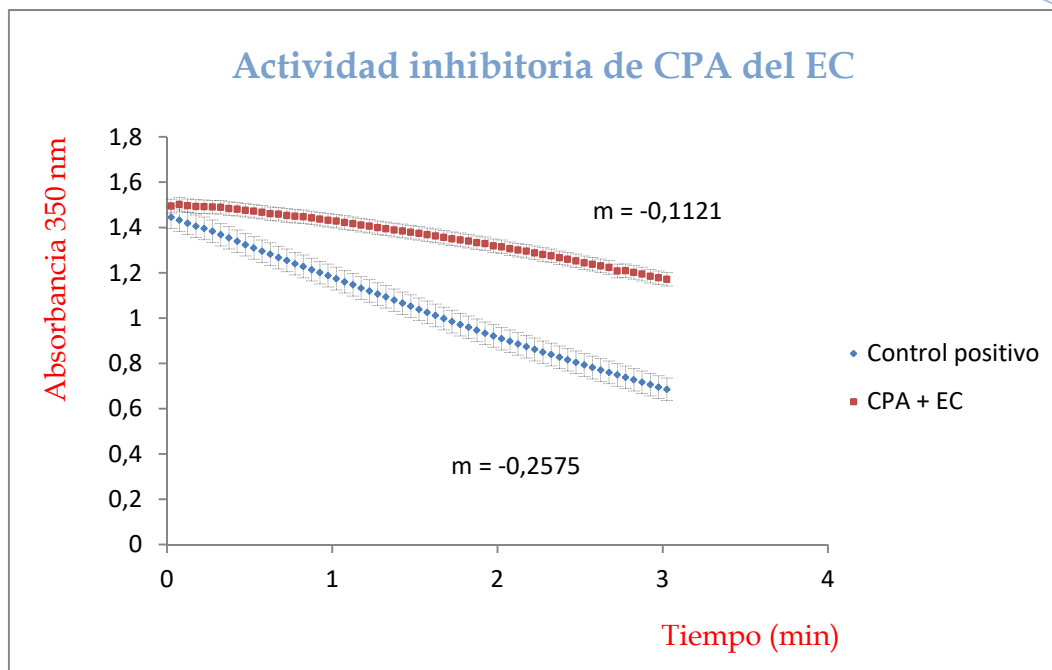
El proceso de obtención del extracto crudo (EC) descrito en M&M 2.1. permitió obtener un extractivo clarificado, libre de partículas de gran tamaño, tales como gomas, resinas, polisacáridos, mucílagos, etc. La concentración de proteínas presentes en el EC determinada por el método de Bradford fue de 858  $\mu\text{g/ml}$ .

## 2. EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS: ENSAYOS DE INHIBICIÓN PROTEOLÍTICA

### 2.1. Actividad inhibitoria de CPA

A fin de buscar una nueva molécula inhibidora de la enzima convertora de angiotensina (ECA), se realizó en primer lugar el ensayo de inhibición de CPA para verificar la presencia de éstos inhibidores en la muestra, dado que ésta enzima es también una metalocarboxipeptidasa y resulta mucho menos costosa que la ECA.

Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 1.



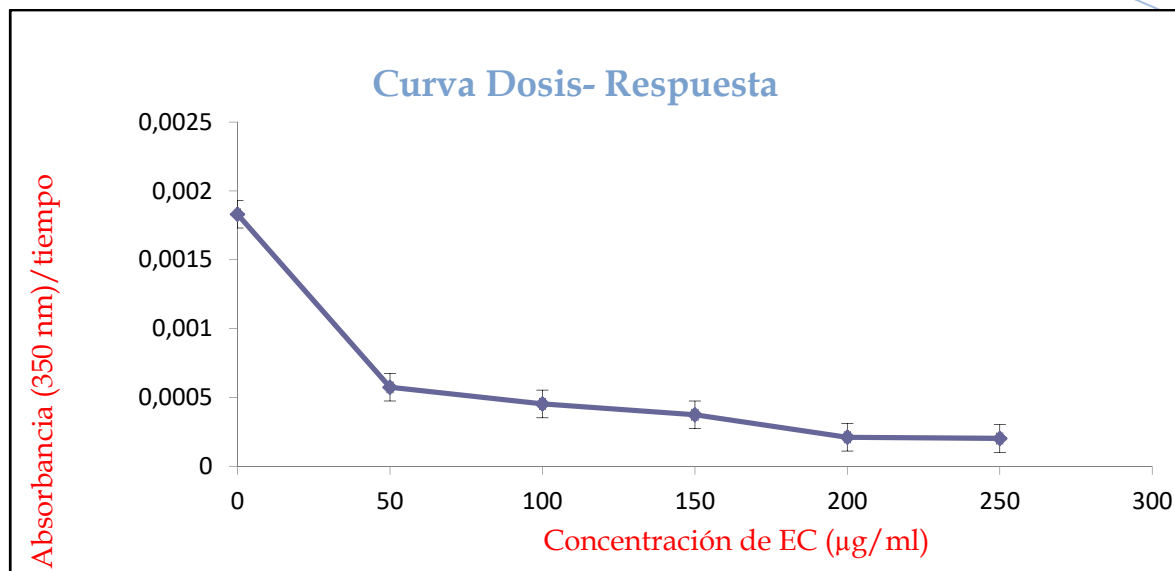
**Figura 1:** En azul se muestra la curva control que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato sin inhibidor (E.C. malcacha). En rojo se muestra la curva que corresponde a la actividad de la CPA con el sustrato en presencia de EC (inhibidor).

Puede observarse que la curva de incubación del extracto crudo con la CPA presentó una menor pendiente respecto a la curva control de CPA. Es decir, que al incubarse la enzima en presencia del extracto crudo, los componentes del mismo (inhibidores) produjeron una disminución en la actividad de la CPA que justifica la diferencia entre las pendientes. En cambio cuando no hay incubación de la enzima con el EC, ésta hidrolizó el sustrato color naranja.

## 2.2. Curva dosis repuesta del EC

Con el fin de verificar la concentración necesaria de EC para inhibir en un 100% la actividad de CPA se realizaron ensayos cinéticos de actividad inhibitoria en presencia de concentraciones crecientes de EC. En la Fig. 2 se grafica la actividad inhibitoria del EC a diferentes concentraciones utilizadas del mismo.





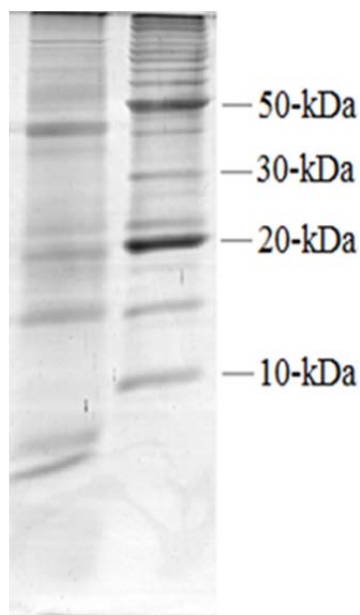
**Figura 2:** Curva dosis repuesta del Extracto Crudo de “malcacha” frente a Carboxipeptidasa A (CPA).

Se puede observar que a medida que creció la concentración de inhibidor (EC), la actividad inhibitoria aumentó hasta alcanzar una concentración de EC de 200 µg/ml, a partir de la cual la actividad de CPA cayó a un valor mínimo que se mantuvo constante con mayores concentraciones de EC.

Esta curva permite además estimar cuál será la concentración de inhibidor (EC) necesaria para disminuir en un 50 % la velocidad de hidrólisis de la enzima CPA (I 0,5) (Cortes et al. 2001). La I 0,5 estimada en éste caso fue aproximadamente de 45 µg/ml.

### 3. PERFIL PROTEICO DEL EC MEDIANTE SDS-PAGE

El perfil electroforético del EC mostró una distribución de tamaños moleculares que abarcaron desde los 3000 Da hasta los 100000 Da. (Fig. 3). Entre sus componentes principales podemos destacar: patatinas (esterasas de aprox. 40000 Da), inhibidores de proteasas, entre las que se destacan cisteínicas, serínicas, aspárticas y metalocarboxipeptidasas, con distribución de pesos moleculares variada, abarcando desde los 3000 a 80000 Da. (Kim 2009).



**Figura 3:** SDS-PAGE del extracto crudo de *Solanum tuberosum* subespecie *andígena* variedad “malcacha”. Calle 1: Extracto crudo. Calle 2: Patrones moleculares (BenchMark™Protein Ladder)

#### 4. PURIFICACIÓN PRELIMINAR DE LOS INHIBIDORES. TRATAMIENTO TÉRMICO

Con el fin de separar gran parte de los componentes proteicos y aislar los inhibidores presentes en el EC de malcacha, se procedió a realizar un tratamiento térmico del extracto crudo como etapa preliminar de purificación. Se sabe que los inhibidores de proteasas de tamaño molecular menor a 30000 Da generalmente presentan cierta estabilidad frente a tratamientos térmicos extremos (Bartová et al. 2008). Por éste motivo se sometió al EC a incubación a distintas temperaturas y se determinó la concentración de proteína residual luego de cada proceso. Finalmente se evaluó la actividad inhibitoria residual en cada caso.

El EC obtenido se incubó a 60°C, 70°C, 85°C, y 100°C durante 60 minutos, luego se centrifugó durante 60 minutos a 13958  $\times$  g, descartando el pellet y quedándonos con el sobrenadante. A cada sobrenadante se lo denominó: TT60, TT70, TT85 y TT100 según el respectivo tratamiento. Se pudo observar que el EC se clarificó notablemente en especial con los tratamientos de 70°C, 85°C y 100 °C, donde la

concentración final de proteínas determinada por el método de Bradford fue de 156  $\mu\text{g/ml}$ , 91  $\mu\text{g/ml}$  y 63  $\mu\text{g/ml}$  respectivamente. En cambio el tratamiento a 60 °C mantuvo mayor porcentaje de proteínas solubles, obteniendo una concentración final de 316  $\mu\text{g/ml}$  (Tabla 1). Considerando al EC como un 100% de proteínas en solución, podemos decir que para TT60 mantuvo un 36 % de proteínas en solución; en cambio para TT70, TT85 y TT100 el porcentaje de proteínas solubles fue de 18%, 10% y 7% respectivamente.

**Tabla 1:** Concentración proteica de cada tratamiento térmico. EC: Extracto Crudo; TT60: Tratamiento Térmico a 60°C; TT70: Tratamiento Térmico a 70°C; TT85: Tratamiento Térmico a 85°C; TT100: Tratamiento Térmico a 100°C.

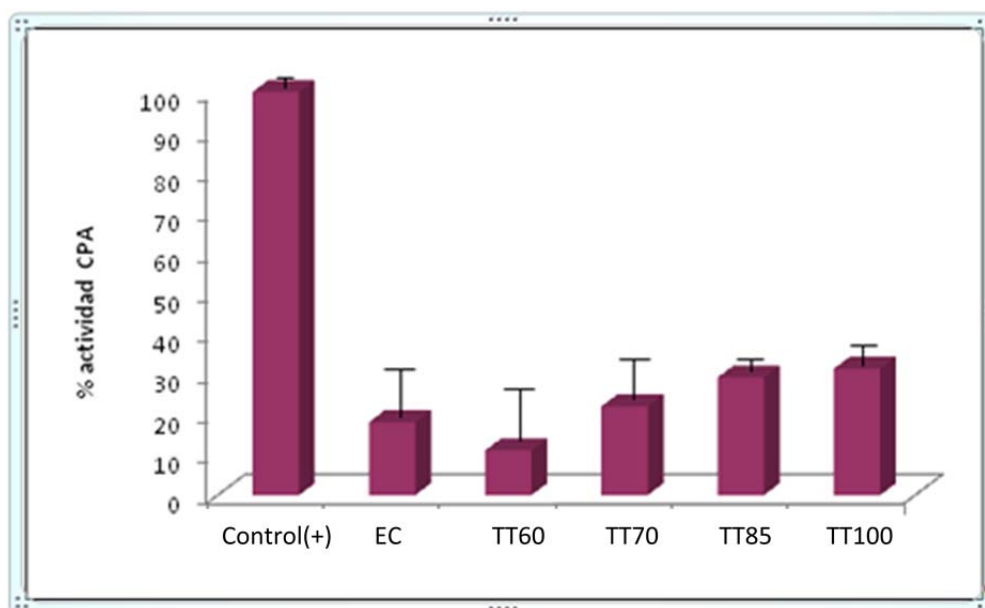
Muestra	Concentración de proteínas
Extracto Crudo	858 $\mu\text{g/ml}$
Extracto Crudo a 60°C (TT60)	316 $\mu\text{g/ml}$
Extracto Crudo a 70°C (TT70)	156 $\mu\text{g/ml}$
Extracto Crudo a 85°C (TT85)	91 $\mu\text{g/ml}$
Extracto Crudo a 100°C (TT100)	63 $\mu\text{g/ml}$

Se puede observar que la concentración de proteínas fue disminuyendo a medida que el extractivo se sometió a mayores temperaturas (desnaturalización térmica). Es de destacar que los tratamientos a 85 °C y 100°C prácticamente no difieren en la concentración final de proteínas.

Para verificar si efectivamente las proteínas residuales son inhibidores, se procedió a determinar actividad inhibitoria de CPA a cada extracto tratado, por triplicado.

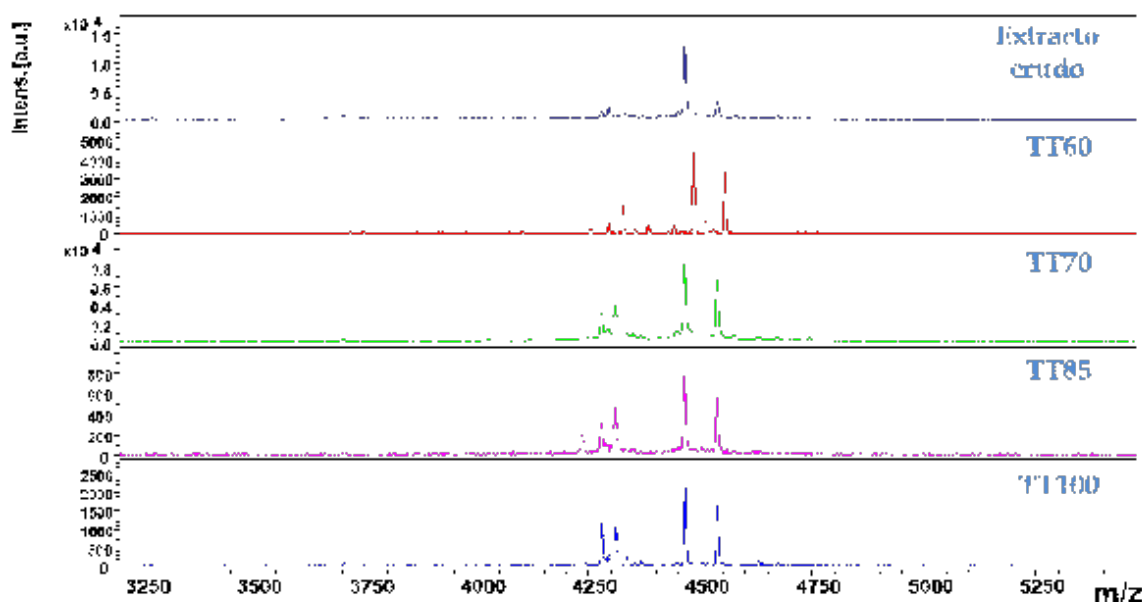
#### 4.1. Evaluación de la actividad inhibitoria de CPA frente a cada tratamiento térmico

Tal como se mencionó anteriormente, a cada tratamiento térmico se le determinó actividad inhibitoria de CPA para evaluar el porcentaje de recuperación de estos inhibidores frente a los diferentes ensayos calóricos. Se pudo observar que los tratamientos térmicos no afectaron a la actividad inhibitoria de la CPA; ésta se mantuvo entre un 70% y 90% de la actividad inicial que presentaba el extracto crudo original (Fig. 4). Como se estableció anteriormente, la concentración de proteínas fue disminuyendo a medida que aumentaba la temperatura de incubación pero la actividad inhibitoria se mantuvo constante, por lo que podemos inferir que en cada tratamiento térmico hay enriquecimiento del inhibidor de CPA y su función biológica no se vio afectada frente a cada proceso.



**Figura 4:** Actividad porcentual de CPA frente los diferentes tratamientos térmicos. Control (+): CPA + Sustrato; EC: CPA + Sustrato + EC; TT60, TT70, TT85 y TT100: CPA + Sustrato + EC tratado a cada temperatura respectivamente.

## 5. ANÁLISIS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI/TOF DEL EC Y LAS MUESTRAS TRATADAS TÉRMICAMENTE



**Figura 5:** Espectros de masas de Extracto Crudo(EC), Tratamiento Térmico a 60°C (TT60), Tratamiento Térmico a 70°C (TT70), Tratamiento Térmico a 85°C(TT85) y Tratamiento Térmico a 100°C(TT100), en el rango de peso molecular que va desde 4250 hasta 4600 Da. aproximadamente.

Sabiendo que el inhibidor de CPA es una molécula muy pequeña, de alrededor 4200 Da (Hass and Ryan, 1981; Hass et al. 1976), que el contenido proteico en las muestras tratadas térmicamente fue disminuyendo a medida que aumentó la temperatura, y que la actividad inhibitoria se mantuvo en cada tratamiento, el objetivo de este análisis fue corroborar por un método proteómico si esas moléculas inhibitorias persistían luego de éstos tratamientos.

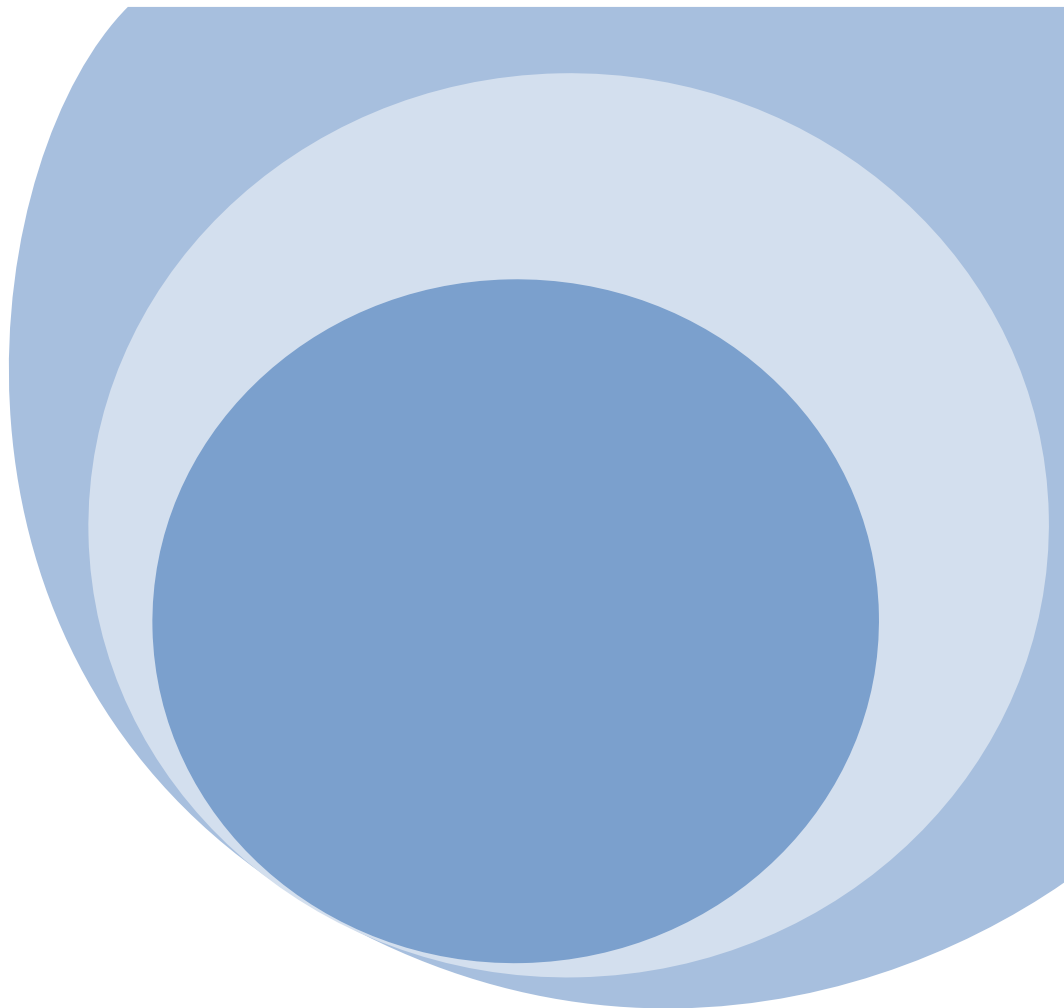
Como podemos apreciar en la Fig. 5, en este rango de peso molecular (4250 Da – 4600 Da) no se observan prácticamente diferencias entre las proteínas que existen en el EC y en los Tratamiento Térmicos, por lo tanto, podemos decir que las

moléculas de este rango de peso molecular, entre las cuales se encuentra el inhibidor de interés, son estables a los tratamientos con calor.

## 6. ENSAYO DE ACTIVIDAD INHIBITORIA DE ECA AL EXTRACTO CRUDO Y A CADA TRATAMIENTO TÉRMICO

Tal como se mencionó en el Capítulo 1 de éste trabajo, la enzima convertora de angiotensina (ECA) es un tipo de metalocarboxipeptidasa, es por ello que se procedió a determinar actividad inhibitoria de ECA al extracto crudo de malcacha y a los diferentes tratamientos térmicos del mismo.

Si bien confirmamos que el inhibidor de CPA mantuvo su actividad con los diferentes tratamientos térmicos, no pudimos observar inhibición de ECA frente a los mismos. En principio podríamos decir que el inhibidor de CPA no inhibe la actividad de ECA.



# REFERENCIAS

- Abad-Zapatero, C., et al. (1998). "Structure of secreted aspartic proteinases from *Candida*. Implications for the design of antifungal agents". Adv Exp Med Biol 436: 297-313.
- Arribas, J. R., Pulido, F., Delgado, R., Lorenzo, A., Miralles, P., Arranz, A (2005). "Lopinavir/ritonavir as single-drug therapy for maintenance of HIV-1 viral suppression: 48-week results of a randomized, controlled, open-label, proof-of-concept pilot clinical trial (OK Study)". J Acquir Immune Defic Syndr 40: 280–287.
- Bartová V., Bárta J. (2008). "Effect of heat treatment on re-solubility of potato proteins isolated from industrial potato fruit juice." RES. AGR. ENG., 54(4): 170–175
- Beavis, R. C.; Chait B. T. (1989). "Factors affecting the ultraviolet laser desorption of proteins." Rapid Commun Mass Spectrom 3(7): 233-7.
- Becker, M. M., Harrop S.A.; Dalton, J.P; Kalinna, B.H.; McManus, D.P.; & Brindley, P.J. (1995). "Cloning and characterization of the *Schistosoma japonicum* aspartic proteinase involved in hemoglobin degradation" J. Biol. Chem. 270 24496-501.
- Bilfinger, T. V.; Stefano, G. B. (2002). "The role of protease inhibition with emphasis on the effects of inflammation and vascular immune phenomena." Curr Pharm Des 8: 505–509.
- Blanco-Aparicio, C. M., M.A.; Fernández-Salas, E.; Frazier, M.L.; Mas, J.M.; Querol, E.; and F. X. d. L. Avilés, R. (1998). "Potato carboxypeptidase inhibitor, a T-knot protein, is an epidermal growth factor antagonist that inhibits tumor cell growth." J. Biol. Chem. 273: 12370-12377



- Bode, W., Huber, R. (1992). "Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinases." Eur J Biochem 204(2): 433-51.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem 72: 248-54.
- Clercq, E. D. (2004). "Antiviral drugs in current clinical use". J Clin Virol. 30: 115-33.
- Cortés, A; Cascante, M; Cárdenas, M L; Cornish-Bowden, A. (2001) "Relationships between inhibition constants, inhibitor concentrations for 50%inhibition and types of inhibition: new ways of analysing data". Biochem.J 357, 263-268
- Dahlgren, A., Kvarnströma I; Vrangb, L; Hamelinkb, E; Hallbergc, A; Rosenquista, A; Samuelssso, B. (2003). "New inhibitors of the malaria aspartyl proteases plasmepsin I and II." Bioorg Med Chem 11(16): 3423-37.
- Gladwell, T. D. (2002). "Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor." Clin Ther 24(1): 38-58.
- Hass G.M., H. A., D.G. Grahn, H. Neurath (1976). "Carboxypeptidase Inhibitor from potatoes. The effects of chemical modification on inhibitory activity." Biochemistry 15: 93-100.
- Hass, G. M. and. Ryan, C.A. (1981). "Carboxypeptidase inhibitor from potatoes." Methods in Enzymology 80: 778-91.
- Hass, G. M. and M. A. Hermodson (1981). "Amino acid sequence of a carboxypeptidase inhibitor from tomato fruit." Biochemistry 20(8): 2256-60.

- Hillenkamp, F. and M. Karas (1990). "Mass spectrometry of peptides and proteins by matrix-assisted ultraviolet laser desorption/ionization." *Methods Enzymol* 193: 280-95.
- Hugli, T. E. (1996). "Protease inhibitors: novel therapeutic application and development." *Trends Biotechnol* 14(11): 409-12.
- Iwanaga, S; Yamasaki, N; Kimura, M; Kouzuma, Y. (2005). "Contribution of conserved Asn residues to the inhibitory activities of Kunitz-type protease inhibitors from plants." *Biosci Biotechnol Biochem* 69(1): 220-3.
- Jedinak, A., & Maliar, T. (2005). "Inhibitors of proteases as anticancer drugs." *Neoplasma* 52: 185–192.
- Kim, J. Y., Park, S. C; Hwang, I; Cheong, H; Nah, J. W; Hahm, K. S; Park, Y. (2009). "Protease inhibitors from plants with antimicrobial activity." *Int J Mol Sci* 10(6): 2860-72.
- Lin, J. Y; Chu, S. C; Wu, H. C; Hsieh, Y. S. (1991). "Trypsin inhibitor from the seeds of *Acacia confusa*." *J Biochem* 110(6): 879-83.
- Milan, Dimitri (1987). *Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Tomo I. Descripción de plantas cultivadas*. ACME S.A.C.I, Buenos Aires.
- Nagase H. (1996). "Zinc Metalloproteases in Health and Disease". Ed Hooper N. M. (Taylor & Francis, London), pp 153–204
- Nissen, M. S., Mohan Kumar, G. N; Youn, B; Knowles, B. D; Sum, L. K; Ballinger, W. J; Knowles, R. N; Kang, C. (2009). "Characterization of *Solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins." *Plant Cell* 21(3): 861-75.

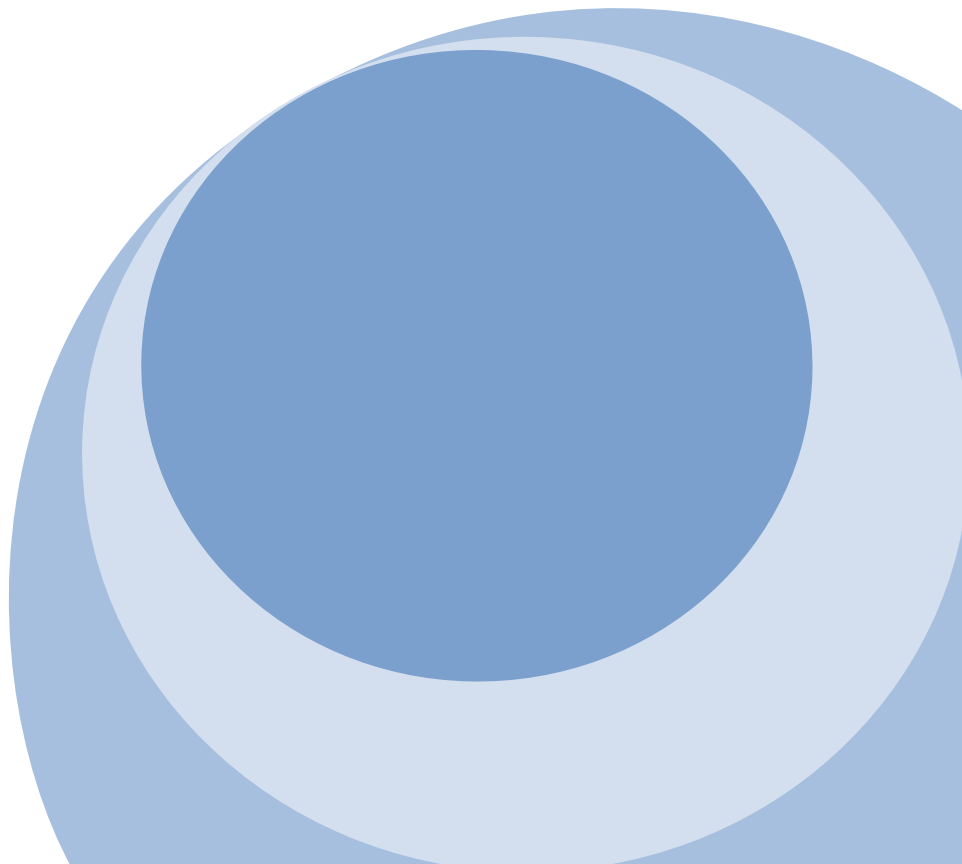
- Oliva, M. L.; Ferreira Rda S, Ferreira, J. G; Paula, C. A; Salas, C. E; Sampaio, M. U.(2011). "Structural and functional properties of kunitz proteinase inhibitors from leguminosae: a mini review". . Curr Protein Pept Sci.;12(5):348-57.
- Ottaviani, J. I; Actis-Goretta, L; Villordo, J. J; Fraga, C. G. (2005). "Procyanidin structure defines the extent and specificity of angiotensin I converting enzyme inhibition." Biochimie 88: 359–365.
- Patick, A. K; Duran, M; Cao, Y; Shugarts, D; Keller, M. R; Mazabel, E; Knowles, M; Chapman, S; Kuritzkes, D. R; Markowits, M. (1998). "Genotypic and phenotypic characterization of human immunodeficiency virus type 1 variants isolated from patients treated with the protease inhibitor nelfinavir." Antimicrob Agents Chemother 42(10): 2637-44.
- Rawlings, N. D., Tolle, D. P; Barrett, A. J. (2004). "Evolutionary families of peptidase inhibitors." Biochem J 378(Pt 3): 705-16.
- Rawlings, N. D; Barrett, A. J; Bateman, A. (2010) "Peptidase inhibitors in the MEROPS database." Biochimie 92(11): 1463-83
- Ryan, C. A., Hass G. M., Kuhn, R. W. (1974). "Purification and properties of a carboxypeptidase inhibitor from potatoes." J Biol Chem 249(17): 5495-9.
- Trow, W. K., A. R. eds. (1993). "Protease inhibitors as cancer chemopreventive agents" Plenum Publishing Corp.
- Vassar R., B. D. B., S. Babu-Khan, S. Kahn, E.A. Mendiaz , P. Denis, D.B. Teplow, S. Ross, P. Amarante, R. Loeloff, Y. Luo, S. Fisher, J. Fuller, S. Edenson, J. Lile, M.A. Jarosinski, A.L. Biere, E. Curran, T. Burgess, J.C. Louis, F. Collins, J. Treanor, G. Rogers & M. Citron (1999 ). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE". Sciencet 22: 735-41.

Vassar, R., et al. (1999). "Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE." Science 286(5440): 735-41

Vendrell, J., Querol, E; Aviles. (2000). "Metallocooxypeptidases and their protein inhibitors. Structure, function and biomedical properties." Biochim Biophys Acta 1477(1-2): 284-98.

Vivanco Jorge M., E. C., Víctor M. Loyola-Vargas y Héctor E. Flores (2005).  
"Mecanismos químicos de defensa en las plantas".

# CONCLUSIONES



De acuerdo a los resultados obtenidos a lo largo de éste trabajo, podemos concluir lo siguiente:

- ◆ Utilizando las enzimas presentes en el EC de *Araujia hortorum* se obtuvo un hidrolizado de lactosuero con un 1% de grado de hidrólisis.
- ◆ Luego de ensayar varios métodos, se eligió la técnica de ultrafiltración para detener la reacción de hidrólisis, una herramienta promisorio en la etapa de pre-concentración de estos péptidos bioactivos.
- ◆ Los hidrolizados obtenidos presentaron el doble de actividad inhibitoria de ECA que el blanco de lactosuero. Estos valores coinciden con los valores de inhibición obtenidos para Captopril con una concentración entre 0,1 y 0,01  $\mu\text{M}$ .
- ◆ Se aisló del hidrolizado un pico mediante RP-HPLC que presentó alta actividad inhibitoria de ECA.
- ◆ El extracto crudo obtenido a partir de tubérculos de “malchaca” presentó una importante actividad inhibitoria de carboxipeptidasa A.
- ◆ Mediante los porcentajes de actividad de CPA se deduce que, en el caso del empleo de los tratamientos térmicos a 70, 85 y 100 °C de “malchaca”, la actividad de la enzima CPA es baja, lo cual demuestra la gran estabilidad térmica del inhibidor.
- ◆ Los espectros de masas permitieron observar el alto grado de purificación logrado luego de realizar cada tratamiento térmico.
- ◆ La I 0,5 del EC estimada fue aproximadamente de 45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .
- ◆ No se observó actividad inhibitoria de ECA en el EC de “malchaca” ni en los extractos tratados térmicamente.